

Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn *Bacillus* sp. có khả năng sinh tổng hợp protease từ các sản phẩm đậu nành lên men

Lê Thị Ngọc Hân^{1,2*}, Võ Thị Ngọc Diệp¹, Trịnh Thị Tuyết Hoa¹, Nguyễn Văn Thành¹

¹Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

²Trường Cao đẳng Kinh tế - Kỹ thuật Cần Thơ

Ngày nhận bài 26/3/2021; ngày chuyển phản biện 30/3/2021; ngày nhận phản biện 7/5/2021; ngày chấp nhận đăng 17/5/2021

Tóm tắt:

Nghiên cứu được thực hiện với mục đích phân lập và tuyển chọn các dòng vi khuẩn *Bacillus* sp. có khả năng sinh protease từ sản phẩm đậu nành lên men. Sử dụng phương pháp đo đường kính vòng thủy phân (halo) trên môi trường Skim milk agar (SMA) và lên men trong môi trường lỏng để đánh giá khả năng sinh protease. Từ các sản phẩm đậu nành lên men thu tại 2 địa phương là An Giang và Cần Thơ, đã phân lập được 29 dòng vi khuẩn. Qua kết quả khảo sát về đặc điểm hình thái và sinh hóa cho thấy 29 dòng vi khuẩn trên thuộc chi *Bacillus*. Kết quả kiểm tra khả năng sinh protease trên đĩa SMA đã tuyển chọn được 8 dòng có đường kính vòng halo lớn. Trong môi trường lên men lỏng với mật số 10^6 tế bào/ml, pH 7,2 ở 37°C trong 48 giờ, chọn được dòng ML01 cho hoạt tính protease đặc hiệu cao nhất 185,92 U/mg. Kết quả phân tích trình tự vùng gen 16S rRNA của dòng ML01 cho thấy có mối quan hệ cao với trình tự của *Bacillus subtilis*.

Từ khóa: *Bacillus*, lên men, protease, vi khuẩn.

Chỉ số phân loại: 2.8

Đặt vấn đề

Protease là một trong những enzyme có nhiều ứng dụng trong các ngành công nghiệp: thực phẩm, dược phẩm, xử lý chất thải... [1]. Protease chủ yếu tham gia vào việc phân cắt các chuỗi peptide dài thành các đoạn ngắn và được sản xuất bởi nhiều nguồn khác nhau như thực vật, động vật và vi sinh vật. Trong đó, vi sinh vật là đối tượng chính sản xuất enzyme nói chung và protease nói riêng, vì có thể sinh trưởng và phát triển trong thời gian ngắn, tạo ra một loại enzyme chuyên biệt, giá thành rẻ và đáng tin cậy [2]. Một số loài vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp protease như *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*... [3]. Trong môi trường nuôi cấy, một lượng lớn protease ngoại bào được tạo ra bởi các vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* [2].

Vi khuẩn *B. subtilis* có khả năng thích nghi cao và sinh tổng hợp được nhiều loại enzyme cần thiết trong quá trình sinh trưởng để thích nghi với điều kiện môi trường. Hàm lượng protein và hoạt tính protease tổng hợp từ *B. subtilis* phụ thuộc vào nhiều yếu tố như: dòng vi khuẩn, điều kiện nuôi cấy, phương pháp thu nhận... [3]. Vì vậy, để thu nhận protease có hoạt tính cao cần lựa chọn nguồn phân lập phù hợp và tối ưu về phương pháp, các điều kiện nuôi cấy... Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập và tuyển chọn dòng vi khuẩn *Bacillus* spp. có khả năng sinh tổng hợp protease với hoạt tính đặc hiệu cao, đây là tiền đề cho các nghiên cứu ứng dụng sau này.

*Tác giả liên hệ: Email: ltnhan@ctec.edu.vn; Tel: 0907299908

Vật liệu và phương pháp

Vật liệu

Mẫu tương hột, chao thành phẩm thu tại Cơ sở sản xuất nước tương Hương Sen (phường Mỹ Hòa, TP Long Xuyên, tỉnh An Giang) và Cơ sở chao Hương Việt (số 118/5 Trưng Nữ Vương, quận Ô Môn, TP Cần Thơ).

Mẫu nước mắm chay và nước tương thu tại hộ kinh doanh Tư Hoa (khóm Trung Hưng, phường Mỹ Thới, TP Long Xuyên, tỉnh An Giang) và Cơ sở nước mắm chay Liên Hương (số 28/5, khu vực 10, phường Châu Văn Liêm, quận Ô Môn, TP Cần Thơ).

Phương pháp nghiên cứu

Phân lập và định danh sơ bộ các dòng vi khuẩn Bacillus spp. từ sản phẩm đậu nành lên men:

Tăng sinh mẫu: cho 1 g mẫu vào 99 ml môi trường minimal Davis (không chứa agar) (pH 7,0±0,2 ở 25°C) có chứa các thành phần như bảng 1, trong điều kiện vô trùng,

Bảng 1. Môi trường minimal Davis nuôi cấy *Bacillus subtilis*.

Hóa chất	Nồng độ (g/l)
K ₂ HPO ₄	7,0
KH ₂ PO ₄	2,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
Glucose	1,0
Sodium Citrate	0,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1
Agar	15,0

Isolation and selection of *Bacillus* sp. with the potential biosynthesis of protease from fermented soybean products

Thi Ngoc Han Le^{1,2*}, Thi Ngoc Diep Vo¹,
Thi Tuyet Hoa Trinh¹, Van Thanh Nguyen¹

¹Biotechnology Research and Development Institute, Can Tho University
²Can Tho Technical Economic College

Received 26 March 2021; accepted 17 May 2021

Abstract:

This study aims to isolate and select strains of *Bacillus* for protease production from fermented soybean products. To evaluate the ability of protease production, the authors applied the hydrolysis diameter measurement method on Skim milk agar (SMA) and submerged fermentation (SmF). The results showed that 29 bacterial strains were isolated from fermented soybean products in An Giang and Can Tho provinces. Based on the morphological and biochemical characteristics of bacteria, these are defined belong to the *Bacillus* genus. The results of the protease generation test on SMA helped to select eight strains with a high halo diameter. In SmF with 10^6 cells/ml, pH 7.2, at 37°C for 48 hours, the ML01 strain gave the highest specific protease activity of 185.92 U/mg. Sequence analysis results of the 16S rRNA gene region of ML01 exhibited a high relationship with the sequence of *Bacillus subtilis*.

Keywords: *Bacillus*, bacteria, protease, submerged fermentation.

Classification number: 2.8

lắc ủ ở 37°C trong 48 giờ. Sau đó đun cách thủy ở 80°C trong 20 phút để loại bỏ tế bào sinh dưỡng.

Phân lập vi khuẩn: mẫu sau tăng sinh được pha loãng từ nồng độ 10^{-1} đến 10^{-5} và trải mẫu ở mỗi nồng độ ra đĩa môi trường minimal agar. Ủ ở 37°C trong 48 giờ, quan sát sự xuất hiện của khuẩn lạc. Tuyển chọn các khuẩn lạc có đặc điểm khác nhau và cấy phân lập nhiều lần để tạo dòng thuần. Dòng vi khuẩn sau khi làm thuần được trữ giống trong môi trường thạch nghiêng ở 4°C.

Phương pháp định danh vi khuẩn *Bacillus*: sử dụng các phương pháp sinh hóa để bước đầu sàng lọc các dòng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*. Các dòng vi khuẩn phân lập được mô tả đặc điểm khuẩn lạc, xác định hình thái bằng phương pháp nhuộm gram, nhuộm bào tử, quan sát hình

dạng, kiểm tra một số đặc tính sinh hóa như thử nghiệm catalase, oxidase, methyl red để xác định vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* [4].

Khảo sát khả năng sinh protease của các dòng vi khuẩn Bacillus spp. đã phân lập trên môi trường SMA:

Môi trường thạch Skim milk (SMA) được phân phối vào đĩa petri, dùng dụng cụ khoan lỗ có kích thước nhỏ (0,5 cm) vào giữa đĩa thạch. Với mỗi dòng vi khuẩn hút 5 µl dịch nuôi sau khi tăng sinh 24 giờ nhỏ vào đĩa môi trường SMA và ủ ở 37°C trong 48 giờ. Hoạt tính protease của các dòng vi khuẩn được đánh giá dựa vào khả năng tạo vòng thủy phân (vòng halo) trên môi trường SMA [5], đường kính thủy phân được tính theo công thức:

Đường kính thủy phân = Đường kính vòng halo - đường kính lỗ khoan.

Tuyển chọn dòng vi khuẩn Bacillus spp. có khả năng sinh protease trong môi trường lỏng:

Cho 100 ml môi trường lên men lỏng (pH 7,2) có các thành phần như bảng 2 [6] vào bình tam giác 250 ml, dùng nút gòn không thấm nước đậy kín miệng bình tam giác, phía trên đậy nắp giấy. Khử trùng ở 121°C trong 20 phút. Sau khi để nguội hoàn toàn, chủng 1 ml dịch tăng sinh vi khuẩn với mật số 10^6 tế bào/ml vào môi trường. Tất cả các mẫu được ủ lắc liên tục với tốc độ 150 vòng/phút ở 37°C. Sau 48 giờ lên men, các mẫu được ly tâm 10.000 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút, thu lấy phần dịch lỏng đem phân tích hoạt tính enzyme.

Bảng 2. Môi trường lên men lỏng.

Hóa chất	Nồng độ (g/l)
Soya Peptone	10
K ₂ HPO ₄	2,0
MgSO ₄	1,0
Glucose	2,0
Maltose	20
Yeast extract	10
Nước cất	Vừa đủ 1.000 ml

Chỉ tiêu phân tích: xác định hoạt tính protease (phương pháp Kunitz cải tiến) [7] và hàm lượng protein (phương pháp Bradford) [8].

Định nghĩa về đơn vị hoạt tính enzyme: 1 đơn vị hoạt tính enzyme (U (Unit)) là lượng enzyme cần thiết để thủy phân casein, tương đương với 1 µM tyrosine sinh ra trong thời gian 1 phút ở nhiệt độ 37°C, pH 7,5.

Hoạt tính đặc hiệu (hoạt tính riêng) là số đơn vị hoạt tính enzyme có trong 1 mg protein (U/mg) [9].

Định danh dòng vi khuẩn có khả năng sinh protease cao nhất bằng phương pháp giải trình tự 16S rRNA:

Phương pháp tách chiết DNA và giải trình tự: sử dụng bộ hóa chất QIAamp DNA Mini Kit để tách chiết DNA và giải trình tự bằng phương pháp Sanger.

Phương pháp định danh: sử dụng phần mềm BLAST để so sánh trình tự gen của dòng vi khuẩn phân lập với trình tự tham chiếu từ cơ sở dữ liệu 16S ribosomal RNA (Bacteria and Archaea type strains). Mẫu được phân tích tại Trung tâm Xét nghiệm kỹ thuật cao Ktest, TP Hồ Chí Minh.

Xử lý số liệu:

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2013 và phần mềm thống kê Statgraphics Centurion XVI.

Kết quả và thảo luận

Phân lập và định danh sơ bộ các dòng vi khuẩn Bacillus spp. từ sản phẩm đậu nành lên men ở tỉnh An Giang và TP Cần Thơ

Kết quả phân lập vi khuẩn:

Tổng cộng có 29 dòng vi khuẩn được phân lập trên môi trường minimal agar từ các sản phẩm đậu nành lên men thu tại An Giang (12 dòng) và Cần Thơ (17 dòng). Ký hiệu các dòng vi khuẩn và địa điểm thu mẫu được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3. Các dòng vi khuẩn phân lập từ các sản phẩm đậu nành lên men.

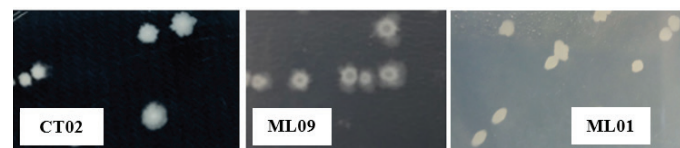
Dòng vi khuẩn	Mẫu	Địa điểm thu mẫu
CTX1, CTX2, CTX3	Chao thành phẩm	Cơ sở Hương Sen (An Giang)
HUX1, HUX2	Đậu nành ủ mốc làm tương hột	
MCX1, MCX2, MCX3	Đậu nành giai đoạn ủ lên men nước mắm chay	Hộ kinh doanh Tư Hoa (An Giang)
TMX1, TMX2, TUX1, TUX2	Đậu nành ủ (2 tuần) làm nước tương	
CM01, CM02, CM03	Chao giai đoạn ủ mốc	Cơ sở chao Hương Việt (Cần Thơ)
CT01, CT02, CT03	Chao thành phẩm	
HL01, HL03, HL05, HL06, HL07, HL08	Đậu nành giai đoạn ủ lên men nước mắm chay	Cơ sở nước mắm chay Liên Hương (Cần Thơ)
ML01, ML09, ML12	Nước mắm chay trước thanh trùng	
T03, T04	Nước tương trước thanh trùng	

Đặc điểm khuẩn lạc và tế bào của các dòng vi khuẩn phân lập được trên môi trường minimal agar sau 48 giờ nuôi cấy thể hiện ở bảng 4 và hình 1.

Bảng 4. Đặc điểm khuẩn lạc và tế bào của 29 dòng phân lập sau 48 giờ nuôi cấy.

Dòng	Đặc điểm khuẩn lạc				Đặc điểm tế bào				
	Hình dạng	Màu sắc	Dạng bia	Độ nổi	Kích thước (mm)	Chuyển động	Hình dạng	Chiều dài (µm)	Chiều rộng (µm)
CTX1	Không đều	Trắng đục	Chia thùy	Phẳng	2-2,5	+	Que ngắn	1,35	0,61
CTX2	Không đều	Trắng đục	Răng cưa	Lài	2-2,5	+	Que ngắn	1,5	0,62
CTX3	Không đều	Trắng đục	Răng cưa	Phẳng	3-3,5	+	Que ngắn	1,6	0,6
HUX1	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Mô	1,5-3	+	Que ngắn	1,3	0,5
HUX2	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Mô	2-3	+	Que ngắn	1,6	0,65
MCX1	Không đều	Trắng đục	Chia thùy	Mô	3,5-4	+	Que ngắn	1,44	0,65
MCX2	Không đều	Trắng trong	Nguyên	Lài	3-4	+	Que ngắn	1,5	0,68
MCX3	Không đều	Trắng đục	Chia thùy	Mô	3-3,5	+	Que ngắn	1,7	0,66
TMX1	Không đều	Trắng đục	Chia thùy	Lài	2-2,5	+	Que ngắn	1,46	0,71
TMX2	Không đều	Trắng trong	Răng cưa	Lài	1,5-2	+	Que ngắn	1,5	0,6
TUX1	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Mô	0,5	+	Que dài	2,0	0,71
TUX2	Không đều	Trắng đục	Răng cưa	Mô	1,5-3	+	Que ngắn	1,5	0,66
CM01	Tròn	Trắng đục	Răng cưa	Lài	4,2-4,4	+	Que ngắn	1,5	0,62
CM02	Tròn	Trắng đục	Răng cưa	Lài	1,8-2	+	Que ngắn	1,2	0,67
CM03	Không đều	Trắng đục	Răng cưa	Mô	2,2-2,4	+	Que ngắn	1,6	0,7
CT01	Tròn	Trắng trong	Nguyên	Mô	3,8-4	+	Que ngắn	1,1	0,65
CT02	Không đều	Trắng đục	Răng cưa	Mô	2,2-3	+	Que ngắn	1,3	0,66
CT03	Không đều	Trắng đục	Răng cưa	Lài	3-3,4	+	Que ngắn	1,2	0,61
HL01	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Lài	2,1-2,3	+	Que ngắn	1,7	0,68
HL03	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Mô	3,5-3,7	+	Que ngắn	1,4	0,63
HL05	Tròn	Trắng đục	Răng cưa	Lài	2,5-2,7	+	Que dài	2,4	0,73
HL06	Không đều	Trắng đục	Răng cưa	Lài	2,6-2,8	+	Que ngắn	1,2	0,61
HL07	Không đều	Trắng đục	Chia thùy	Mô	4,2-5	+	Que ngắn	1,6	0,71
HL08	Tròn	Trắng đục	Răng cưa	Lài	1,5-1,7	+	Que ngắn	1,2	0,65
ML01	Không đều	Trắng ngà	Chia thùy	Lài	2,5-3,0	+	Que dài	2,0	0,65
ML09	Không đều	Trắng đục	Chia thùy	Lài	2,9-4	+	Que ngắn	1,5	0,67
ML12	Không đều	Trắng đục	Nguyên	Lài	2,2-2,5	+	Que dài	2,2	0,71
T03	Không đều	Trắng trong	Răng cưa	Lài	4-6	+	Que ngắn	1,5	0,6
T04	Tròn	Trắng ngà	Nguyên	Lài	3,3-3,7	+	Que ngắn	1,3	0,65

(+): có chuyển động.



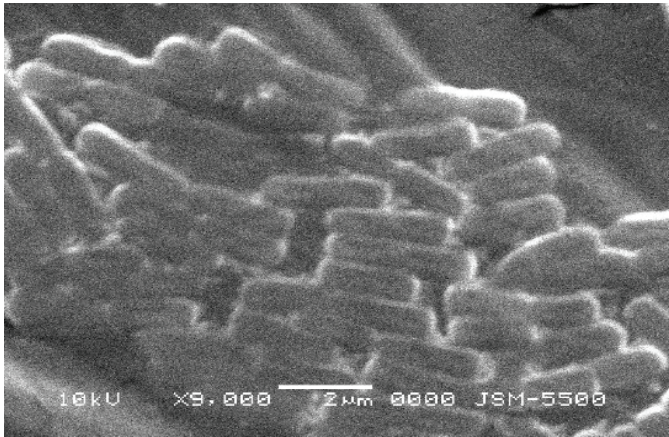
Hình 1. Hình dạng khuẩn lạc của một số dòng vi khuẩn phân lập. CT02: khuẩn lạc trắng đục, tròn không đều, bia răng cưa, mô; **ML09:** khuẩn lạc trắng đục, tròn không đều, bia chia thùy, lài; **ML01:** khuẩn lạc trắng ngà, tròn không đều, bia chia thùy, lài.

Định danh vi khuẩn Bacillus:

Tất cả 29 dòng vi khuẩn phân lập đều có khả năng chuyển động khi quan sát bằng phương pháp giọt ép dưới

kính hiển vi ở vật kính 100X [10].

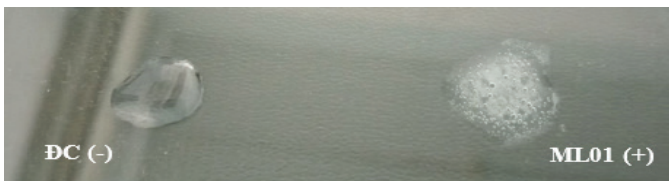
Tế bào vi khuẩn của tất cả các dòng phân lập đều có dạng hình que ngắn hoặc dài (hình 2) [10], kích thước dao động từ 0,5 μm đến 2,4 μm và có nội bào tử. Nội bào tử hình bầu dục, nằm giữa hay trong khoảng từ trung tâm đến gần cuối tế bào, mỗi tế bào chỉ tạo một bào tử. Bào tử chiếm 70%, bắt màu xanh của dung dịch malachite green [11, 12].



Hình 2. Tế bào hình que của dòng vi khuẩn ML01 được chụp dưới kính hiển vi điện tử quét.

Kết quả nhuộm Gram cho thấy, 29 dòng vi khuẩn phân lập bắt màu tím xanh của dung dịch violet, chứng tỏ các dòng vi khuẩn này thuộc nhóm vi khuẩn Gram dương (+) [11].

Thử nghiệm catalase: 29 dòng vi khuẩn có hiện tượng hình thành bọt khí (hình 3), chứng tỏ các dòng này đều có enzyme catalase phân giải H₂O₂ thành H₂O và O₂ [13, 14].



Hình 3. Thử nghiệm catalase (ĐC: Âm tính, ML01: Dương tính).

Thử nghiệm oxidase: được thực hiện trên đĩa giấy có tấm N-dimethyl-para phenylenediamine. Kết quả 29 dòng vi khuẩn phân lập đều có hiện tượng xuất hiện phức hợp màu tím/xanh đậm sau 10-30 giây (dương tính) (hình 4), chứng tỏ các dòng này đều có enzyme oxidase [15].



Hình 4. Thử nghiệm oxidase (ĐC: Âm tính, ML01: Dương tính).

Thử nghiệm methyl red: kết quả tất cả các dòng vi khuẩn phân lập được đều làm môi trường thử chuyển sang màu cam hoặc màu đỏ, hay nói cách khác là dương tính với thuốc thử methyl red. Vì một số loài vi khuẩn điển hình là chi *Bacillus* có khả năng lên men đường sinh acid nên khi cho 1-5 giọt methyl red vào sẽ làm đổi màu môi trường thành màu cam, đỏ, hay đỏ nhạt tùy theo mức độ nhiều hay ít của lượng acid tạo thành, nếu không tạo acid môi trường sẽ có màu vàng [13, 16].

Dựa theo khóa phân loại Bergey cho thấy, 29 dòng vi khuẩn phân lập từ các mẫu đậu nành lên men trên môi trường phân lập chọn lọc có các đặc điểm khuẩn lạc, hình dạng tế bào (bảng 4), khả năng di động, Gram dương, có nội bào tử, catalase dương tính, oxidase dương tính và có khả năng lên men đường. Như vậy các dòng vi khuẩn này được xác định thuộc chi *Bacillus* [17].

Khả năng sinh tổng hợp protease trên môi trường SMA

Hoạt tính protease của các dòng vi khuẩn được đánh giá dựa vào khả năng tạo vòng thủy phân trên môi trường SMA (bảng 5 và hình 5).

Bảng 5. Khả năng sinh tổng hợp protease của các dòng vi khuẩn.

STT	Dòng	Sinh protease	Đường kính thủy phân (cm)	STT	Dòng	Sinh protease	Đường kính thủy phân (cm)
1	CTX1	+	1,5 ^{hijk}	16	CT01	+	2,33 ^{ab}
2	CTX2	+	2,07 ^{bcde}	17	CT02	+	1,3 ^{kl}
3	CTX3	+	2,2 ^{abcd}	18	CT03	+	2,26 ^{abc}
4	HUX1	+	1,87 ^{efg}	19	HL01	+	1,53 ^{bij}
5	HUX2	+	1,23 ^{kl}	20	HL03	+	1,23 ^{kl}
6	MCX1	+	1,7 ^{ghi}	21	HL05	+	1,53 ^{bij}
7	MCX2	+	2,23 ^{abc}	22	HL06	+	2,1 ^{bcde}
8	MCX3	+	2,0 ^{edef}	23	HL07	+	1,46 ^{hijk}
9	TMX1	+	1,5 ^{hijk}	24	HL08	+	1,73 ^{fgh}
10	TMX2	+	2,2 ^{abcd}	25	ML01	+	2,4 ^a
11	TUX1	+	2,17 ^{abcd}	26	ML09	+	1,17 ^l
12	TUX2	+	1,43 ^{ijkl}	27	ML12	+	1,43 ^{ijkl}
13	CM01	+	2,43 ^a	28	T03	+	1,53 ^{bij}
14	CM02	+	1,93 ^{defg}	29	T04	+	1,33 ^{kl}
15	CM03	+	1,53 ^{bij}				

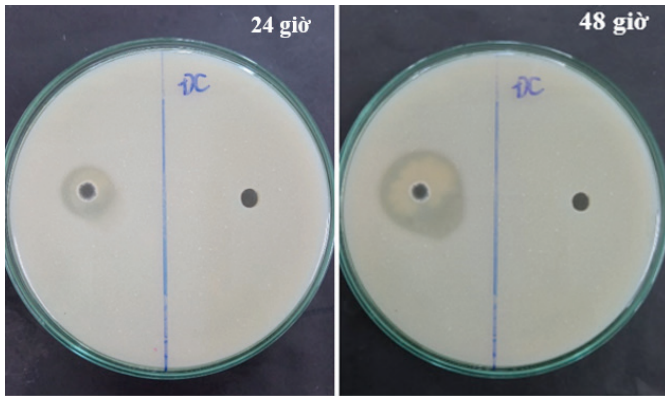
Số liệu ở cột trong bảng là trung bình ba lần lặp lại. Trong cùng một cột, các số mang số mũ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5% theo phép thử Duncan (p<0,05) và ngược lại. (+): có sinh tổng hợp protease.

Kết quả từ bảng 5 cho thấy sau 48 giờ, 29 dòng vi khuẩn đều có khả năng sinh protease thể hiện qua vòng thủy phân trên môi trường sữa (đạt 100%), thấp nhất là ML09 (1,17 cm) và cao nhất là CM01 (2,43 cm); trong đó 8 dòng có khả năng tạo vòng thủy phân với đường kính lớn hơn so với các dòng còn lại: CTX3 (2,2 cm), MCX2 (2,23 cm), TMX2 (2,2

cm), TUX1 (2,17 cm), CM01 (2,43 cm), CT01 (2,33 cm), CT03 (2,26 cm) và ML01 (2,4 cm).

So sánh khả năng sinh protease với nghiên cứu khác thì các dòng vi khuẩn phân lập có khả năng tạo vòng halo thấp hơn dòng *Bacillus subtilis* C10 (3,8 cm) của N.T.A. Thu và cs (2020) [18]. Das và Prasad (2010) [5] cũng ghi nhận enzyme protease sau khi tinh sạch của các dòng vi khuẩn *Bacillus* phân lập từ vùng Bangalore đều tạo vòng thủy phân trên đĩa SMA.

Đường kính vòng halo tạo ra giữa các dòng vi khuẩn khác nhau là do khả năng sinh protease của các dòng vi khuẩn khác nhau. Đường kính càng lớn nghĩa là vi khuẩn có khả năng tiết ra protease càng nhiều. Như vậy có thể kết luận sơ bộ 8 dòng vi khuẩn trên có khả năng sinh protease hoạt tính cao hơn các dòng khác trong 29 dòng vi khuẩn phân lập, do đó 8 dòng này được chọn cho khảo sát tiếp theo.



Hình 5. Vòng halo do protease tạo thành trên môi trường SMA của dòng vi khuẩn ML01 sau 24 và 48 giờ.

Khả năng sinh tổng hợp protease trên môi trường lỏng

Từ kết quả kiểm tra khả năng sinh protease trên môi trường SMA, 8 dòng vi khuẩn là CTX3, MCX2, TMX2, TUX1, CM01, CT01, CT03, ML01 được chọn lên men trong môi trường lỏng để xác định hoạt tính đặc hiệu protease từ hàm lượng protein và hoạt tính protease.

Hoạt tính đặc hiệu của chế phẩm enzyme đặc trưng cho độ tinh sạch của chế phẩm enzyme đó. Hoạt tính đặc hiệu được biểu thị bằng số đơn vị hoạt tính enzyme có trong 1 mg protein (U/mg) [9]. Vì thế hoạt tính đặc hiệu là chỉ tiêu được chọn để xác định dòng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp protease ở môi trường lỏng, dòng vi khuẩn có hoạt tính đặc hiệu cao thì khả năng sinh tổng hợp protease mạnh.

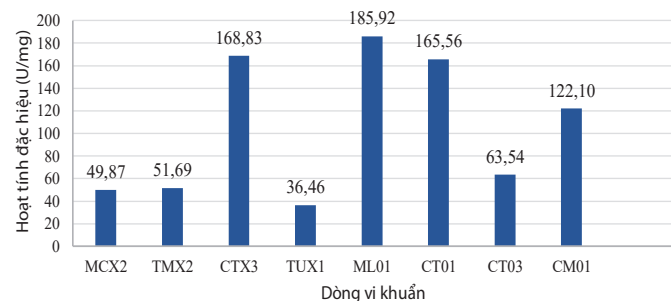
Kết quả trình bày ở bảng 6 cho thấy 8 dòng vi khuẩn đều có khả năng sinh tổng hợp protease trong môi trường lỏng, hoạt tính đặc hiệu protease là khá cao và có sự chênh lệch giữa 8 dòng phân lập.

Bảng 6. Hàm lượng protein, hoạt tính và hoạt tính đặc hiệu protease của 8 dòng vi khuẩn.

Dòng vi khuẩn	Hàm lượng protein (mg/ml)	Hoạt tính protease (U/ml)	Hoạt tính đặc hiệu (U/mg)
MCX2	0,189 ^b	9,43 ^{de}	49,87 ^c
TMX2	0,199 ^b	10,15 ^{de}	51,69 ^c
CTX3	0,203 ^b	31,01 ^b	168,83 ^{ab}
TUX1	0,109 ^c	3,98 ^e	36,46 ^c
ML01	0,086 ^{cd}	15,96 ^{cd}	185,92 ^a
CT01	0,052 ^d	25,95 ^{bc}	165,56 ^{ab}
CT03	0,093 ^{cd}	17,73 ^{cd}	63,54 ^c
CM01	0,359 ^a	43,79 ^a	122,10 ^b

Số liệu ở cột trong bảng là trung bình ba lần lặp lại. Trong cùng một cột, các số mang số mũ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5% theo phép thử Duncan ($p < 0,05$) và ngược lại.

Hoạt tính protease đặc hiệu dao động từ 36,46-185,92 U/mg, trong đó, dòng TUX1 có hoạt tính protease đặc hiệu thấp nhất là 36,46 U/mg, dòng ML01 có hoạt tính protease đặc hiệu cao nhất là 185,92 U/mg (hình 6), khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% so với các dòng vi khuẩn còn lại. Như vậy, ML01 là dòng vi khuẩn có hoạt tính đặc hiệu protease cao nhất, kết quả này cao hơn kết quả của một số nghiên cứu trước đó: dòng *Bacillus* sp. CK 11-4 được Kim và cs [19] phân lập từ một loại sốt đậu nành lên men truyền thống của Hàn Quốc cho hoạt tính đặc hiệu protease là 19,2 U/mg; hoạt tính đặc hiệu protease của dòng BL2 do Aderibge và cs (1990) [20] phân lập và tuyển chọn từ đậu lên men ở châu Phi là 19,06 U/mg.



Hình 6. Hoạt tính đặc hiệu của 8 dòng vi khuẩn.

Kết quả định danh dòng vi khuẩn ML01

- Phương pháp sinh hóa: ML01 có các đặc điểm khuẩn lạc (hình dạng không đều, màu trắng ngà, bìa chia thùy, lồi), tế bào hình que dài, có khả năng di động, Gram dương, có nội bào tử, catalase dương tính, oxidase dương tính và có khả năng lên men đường. Như vậy dòng vi khuẩn này được xác định thuộc chi *Bacillus* [17].

- Phương pháp giải trình tự cho thấy ML01 có độ tương đồng 99,86% so với trình tự gen 16S rRNA của *Bacillus subtilis* (số đăng ký trên genbank là NR_112686.1).

Bacillus subtilis là loài vi khuẩn quan trọng để sản xuất protease ứng dụng trong công nghiệp và y học [21], do đó tiềm năng sản xuất protease của dòng ML01 là rất lớn.

Kết luận

Từ các sản phẩm đậu nành lên men thu tại các sở sản xuất ở Cần Thơ và An Giang đã phân lập được 29 dòng vi khuẩn. Dựa vào các đặc điểm khuẩn lạc, hình thái tế bào và sinh hóa đã xác định các dòng phân lập thuộc chi *Bacillus*. Trong đó đã tuyển chọn được 8 dòng vi khuẩn có khả năng sinh protease cao: CTX3, MCX2, TMX2, TUX1, CM01, CT01, CT03 và ML01 với đường kính vòng halo từ 1,17 cm đến 2,43 cm. Trong môi trường lên men lỏng, chọn được dòng ML01 có khả năng sinh protease cao nhất là 185,92 U/mg, dòng vi khuẩn này có trình tự 16S rRNA tương đồng cao với trình tự của *Bacillus subtilis*. Nghiên cứu đã góp phần làm tăng nguồn giống vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp protease với hoạt lực cao ứng dụng trong các ngành công nghiệp tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Đỗ Thị Bích Thủy, Phan Thị Bé, Đoàn Thị Thanh Thảo (2015), “Định danh và nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng lên khả năng sinh tổng hợp protease ngoại bào của *Bacillus subtilis* DC5”, *Tạp chí Sinh học*, **37(1)**, tr.177-183.
- [2] M. Prasanth, N. Marathe, S. Jadhav, S. Slathia, A. Ramankannan, T. Shanthini, N. Ramesh (2016), “Potential of *Bacillus subtilis* to produce acidic protease under mutagenic condition”, *International Journal of Pure Applied Bioscience*, **4(1)**, pp.126-132.
- [3] Nguyễn Hữu Tuyển, Phạm Tiến Dũng, Phan Thị Kim Ngân, Ngô Võ Kế Thành (2019), “Tối ưu điều kiện sinh tổng hợp protease từ vi khuẩn *Bacillus subtilis* Bs04 và xác định đặc tính của enzyme”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, **61(8)**, tr.12-17.
- [4] F. Sharmin, M. Rahman (2007), “Isolation and characterization of protease producing *Bacillus* strain FS-1”, *Agricultural Engineering International: the CIGR Ejournal*, **IX**, pp.1-10.
- [5] G. Das, M.P. Prasad (2010), “Isolation, purification and mass production of protease enzyme from *Bacillus subtilis*”, *International Research Journals of Microbiology*, **1(2)**, pp.26-31.
- [6] K.I. Eldeen, H.M. Ibrahim, E.E. Elkhidir, H.B. Elamin (2015), “Optimization of culture conditions to enhance nattokinase production using RSM”, *American Journal of Microbiological Research*, **3(5)**, pp.165-170.
- [7] M. Kunitz (1947), “Crystalline soyabean trypsin inhibitor. II. General properties”, *The Journal of General Physiology*, **30(4)**, pp.291-310.
- [8] M.M. Bradford (1976), “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding”, *Analytical Biochemistry*, **72**, pp.248-254.
- [9] Nguyễn Châu Sang, Nguyễn Thị Hà (2014), “Tinh sạch và khảo sát một số đặc điểm của protease chịu kiềm từ *Bacillus* sp. SV1”, *Tạp chí*

Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học, **35**, tr.48-55.

- [10] Nguyễn Lân Dũng, Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Thanh Hiền, Lê Đình Lương, Đoàn Xuân Mỵ, Phạm Văn Ty (1978), *Các phương pháp nghiên cứu vi sinh vật*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
- [11] A.R. Perez, A. Abanes, K. Poliano (2000), “SpoIIB localizes to active sites of septal biogenesis and spatially regulates septal thinning during engulfment in *Bacillus subtilis*”, *Journal of Bacteriology*, **182(4)**, pp.1096-1108.
- [12] P. Chantawannakula, A. Oncharoena, K. Klanbuta, E. Chukeatiroteb, S. Lumyonga (2002), “Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand”, *Science Asia*, **28**, pp.241-245.
- [13] S.M. Cutting, P.B. Vander Horn (1990), *Molecular biological methods for Bacillus*, John Wiley & Sons, Ltd., pp.27-74.
- [14] M. Nagel, J.R. Andreesen (1991), “*Bacillus niacini* sp. nov., a nicotinate-metabolizing mesophile isolated from soil”, *International Journal of Systematic Bacteriology*, **41(1)**, pp.5-26.
- [15] Nguyễn Văn Phúc, Phan Thị Phương Trang (2014), “Phân lập, định danh và xác định các đặc tính có lợi của chủng *Bacillus* spp. từ ao nuôi tôm ở tỉnh Bến Tre”, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Sư phạm TP Hồ Chí Minh*, **64**, tr.94-102.
- [16] C. Ash, J.A.E. Farrow, S. Wallbanks, M.D. Collins (1991), “Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small - subunit - ribosomal RNA sequences”, *Letters in Applied Microbiology*, **13(4)**, pp.202-206.
- [17] D.H. Bergey, R.S. Breed (1957), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams & Wilkins Company, Baltimore.
- [18] N.T.A. Thu, N.T.M. Khue, N.D. Huy, N.Q.D. Tien, D.T.B. Thuy, N.H. Loc (2020), “Characterizations and fibrinolytic activity of serine protease from *Bacillus subtilis* C10”, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, **21**, pp.1-7.
- [19] W. Kim, K. Choi, Y. Kim, H. Park, J. Choi, Y. Lee, H. Oh, I. Kwon, S. Lee (1996), “Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang”, *Application and Environment Microbiology*, **62(7)**, pp.1488-2482.
- [20] E.Y. Aderibgebe, B. Schinkt, S.A. Odufa (1990), “Extracellular proteinase of *Bacillus* spp. isolated from fermented African locust bean, Iru”, *Food Microbiology*, **7(4)**, pp.281-293.
- [21] J.G.D.S. Aguilar, H.H. Satto (2018), “Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates”, *Food Research International*, **103**, pp.253-262.