

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN *Bacillus* sp. CÓ KHẢ NĂNG TỔNG HỢP PROTEASE TỪ SẢN PHẨM ĐẬU NÀNH LÊN MEN

Lê Thị Ngọc Hân^{1,2,*}, Trịnh Thị Tuyết Hoa², Võ Thị Ngọc Diệp², Nguyễn Văn Thành²

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện với mục đích phân lập và tuyển chọn được dòng vi khuẩn *Bacillus subtilis* có khả năng tổng hợp protease có hoạt tính đặc hiệu cao 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 được thu tại các địa điểm khác nhau tại thành phố Cần Thơ và các tỉnh Đồng Tháp, Sóc Trăng, Hậu Giang, phân lập được 48 dòng vi khuẩn, kết quả định danh sơ bộ dựa vào đặc điểm hình thái (tế bào và khuẩn lạc) và sinh hóa (nhuộm gram, khả năng sinh bào tử, khả năng sinh catalase và kiểm tra methyl red) cho thấy các dòng này thuộc giống *Bacillus*. Tất cả các dòng vi khuẩn đều có khả năng phân giải trên môi trường SMA, trong đó có 5 dòng tạo thành vòng halo lớn hơn các dòng còn lại. Dòng vi khuẩn TV3 được xác định là dòng vi khuẩn có khả năng sinh protease cao nhất ở môi trường lên men trong 48 giờ, nhiệt độ 37°C và pH 7,2 với hoạt tính protease được xác định là 48,73 U/mL và hoạt tính đặc hiệu đạt 178,44 U/mg. Định danh dòng vi khuẩn TV3 bằng phương pháp giải trình tự vùng 16S rRNA theo phương pháp Sanger và so sánh với cơ sở dữ liệu của phần mềm BLAST, kết quả xác định dòng TV3 thuộc loài *Bacillus subtilis* có độ tương đồng 99,93% với trình tự 16S rRNA của *Bacillus subtilis* (NR027552.1).

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, lên men lỏng phân lập, protease, vi khuẩn.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Protease (EC.3.4.21-24, 99 còn được gọi là peptidase hay proteinase) [12], là một nhóm các enzyme có chức năng xúc tác thủy phân các liên kết peptide của protein và phá vỡ thành polypeptide hoặc acid amin tự do [7], chúng được sử dụng rộng rãi trong các ngành công nghiệp [4]. Nguồn thu nhận protease rất đa dạng, bao gồm tất cả các sinh vật sống như thực vật, động vật và vi sinh vật. Protease được sản xuất từ vi sinh vật đóng vai trò quan trọng trong nhiều ngành công nghiệp vì chúng sinh trưởng nhanh, không có sự hạn chế về không gian phát triển như động vật và thực vật, bên cạnh đó vi sinh vật có thể dễ dàng xử lý biến dị di truyền để tổng hợp enzyme mới với mục đích mong muốn [9].

Các sản phẩm lên men truyền thống từ đậu nành của Việt Nam đã được sử dụng từ xa xưa, đặc biệt là ở miền Bắc và miền Nam Việt Nam [10] như: Chao, nước tương, tương hột... Các sản phẩm này sử dụng đa dạng nguồn nguyên liệu và điều kiện lên men nên

có mùi vị và tính chất vật lý khác nhau (màu sắc, độ ẩm và hương vị) [10]. Nhiều loài *Bacillus* được tìm thấy trong các sản phẩm đậu nành lên men [7]. Ogbadu và cs. (1990) [17] đã phân lập được nhiều loài *Bacillus* từ đậu nành lên men tại Nigeria như *B. subtilis*, *B. laterosporus*, *B. brevis*,...

Bacillus spp. là dòng vi khuẩn tạo ra protease được sử dụng nhiều nhất trên thị trường. Theo thống kê, enzyme từ *Bacillus* spp. chiếm khoảng 50% tổng thị trường enzyme protease [15]. Các loài *Bacillus* được ứng dụng công nghiệp vì chúng có tốc độ sinh trưởng nhanh dẫn đến thời gian chu kỳ lên men ngắn, có khả năng tiết protease vào môi trường ngoại bào và an toàn đối với sức khỏe con người, tiêu biểu như các loài *B. subtilis* và *B. licheniformis*, *B. amyloliquifaciens* và *B. mojavensis* [15], trong đó *B. subtilis* là nguồn sản xuất protease và amylase chính [8]. Vì các lý do trên, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu phân lập và tuyển chọn được dòng vi khuẩn *B. subtilis* có khả năng sinh protease làm cơ sở đa dạng hóa nguồn thu nhận và tạo tiền đề sản xuất enzyme này với chất lượng và năng suất cao.

¹ Trường Cao đẳng Kinh tế - Kỹ thuật Cần Thơ

² Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

*Email: ltnhan@ctec.edu.vn

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Vi khuẩn *Bacillus* spp. được phân lập từ các sản phẩm đậu nành lên men như đậu nành ủ làm nước tương, tương hột và tương xay; chao (giai đoạn chao ủ mốc trước khi cho nước muối vào và chao thành phẩm); nước tương (chưa thanh trùng); tương hột (ủ

sau 15 ngày, ủ sau 2 tháng và thành phẩm) và tương xay thành phẩm tại các cơ sở sản xuất trên địa bàn quận Ninh Kiều (thành phố Cần Thơ), thành phố Sa Đéc (tỉnh Đồng Tháp), thành phố Sóc Trăng (tỉnh Sóc Trăng), thị xã Ngã Bảy và Châu Thành A (tỉnh Hậu Giang).

Bảng 1. Thành phần môi trường Minimal Davis, môi trường tăng sinh và môi trường lên men lỏng

Môi trường Minimal Davis (pH 7 ± 0,2)		Môi trường lên men lỏng (pH 7,2)		Môi trường Skim milk agar (SMA) (pH 7 ± 0,2)		Môi trường tăng sinh	
Hóa chất	Nồng độ (g/L)	Hóa chất	Nồng độ (g/L)	Hóa chất	Nồng độ (g/L)	Hóa chất	Nồng độ (g/L)
K ₂ HPO ₄	7	Soya peptone	10	Bột sữa gầy	28	Peptone	15
KH ₂ PO ₄	2	Yeast extract	10	Tryptone	5	Tryptone	5
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	Maltose	20	Yeast extract	2,5	Yeast extract	10
Glucose	1	Glucose	2	Dextrose (Glucose)	1	NaCl	5
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	0,5	K ₂ HPO ₄	2	Agar	15		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1	MgSO ₄	1				
Agar	15,0						

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập và định danh sơ bộ các dòng vi khuẩn *Bacillus* spp.

Các dòng vi khuẩn được phân lập trên môi trường Minimal Davis. Cân 1 g mẫu cho vào 99 mL môi trường Minimal Davis (không bổ sung agar) vô trùng, lắc ủ trong 48 giờ sau đó tiến hành sốc nhiệt ở 80°C trong 20 phút loại bỏ tế bào dinh dưỡng. Trãi mẫu rồi chọn các khuẩn lạc có hình dạng, kích thước và màu sắc khác nhau, cấy chuyển nhiều lần trên môi trường Minimal Davis nhằm thu được các dòng vi khuẩn có hình dạng tế bào đồng nhất khi quan sát dưới kính hiển vi.

Kiểm tra các đặc tính sinh hóa của các dòng vi khuẩn bao gồm nhuộm gram, kiểm tra khả năng sinh bào tử, khả năng sinh catalase và kiểm tra methyl red. Định danh sơ bộ các dòng vi khuẩn theo phương pháp của Trương Thị Minh Hạnh và cs. (2016) [22]; Sharmin và Rahman (2007) [21].

2.2.2. Khảo sát khả năng sinh protease của vi khuẩn *Bacillus* spp. trên môi trường SMA

Môi trường SMA sau khi khử trùng được phân phối vào các đĩa petri, sau đó dùng dụng cụ khoan lỗ với kích thước 0,5 cm. Với mỗi dòng vi khuẩn, rút 5

µL dịch tăng sinh cho vào lỗ, ủ ở 37°C trong 24 giờ - 48 giờ, các dòng vi khuẩn có hoạt tính protease sẽ tạo vòng halo trong suốt trên môi trường SMA [11]. Đo đường kính thủy phân để xác định khả năng sinh protease của các dòng vi khuẩn và được đánh giá theo công thức:

Đường kính thủy phân = Đường kính vòng halo - Đường kính giọt dịch nuôi vi khuẩn

2.2.3. Tuyển chọn dòng vi khuẩn *Bacillus* spp. có khả năng sinh protease ở môi trường lỏng

Các dòng vi khuẩn được tăng sinh bằng cách dùng kim cấy vô trùng lấy khuẩn lạc cho vào 100 mL môi trường tăng sinh đã được khử trùng, lắc ở nhiệt độ phòng 24 giờ - 48 giờ sau đó thu lấy dịch tăng sinh vi khuẩn. Cho 100 mL môi trường lên men vào bình tam giác 250 mL, khử trùng ở 121°C trong 20 phút. Sau khi môi trường đã nguội, chủng 1 mL dịch tăng sinh vi khuẩn với mật số 10⁶ tế bào/mL vào và ủ lắc ở 37°C trong 48 giờ. Thu lấy dịch lên men, ly tâm 10.000 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút, rút lấy phần dịch trong phía trên để xác định các chỉ tiêu.

Hàm lượng protein được xác định theo phương pháp Bradford (Bradford, 1976) [6] dựa trên phản ứng tạo màu giữa protein và thuốc thử Coomassie Brilliant

Blue G250. Hỗn hợp phản ứng được đo độ hấp thụ ở bước sóng 595 nm và dựa vào đường chuẩn của protein tinh khiết suy ra hàm lượng protein của mẫu.

Xác định hoạt tính protease bằng phương pháp Kunitz cải tiến [13], kết quả được tính dựa vào phương trình đường chuẩn tyrosine theo đơn vị U, là lượng enzyme cần thiết thủy phân casein giải phóng ra 1 μmol tyrosine trong 1 phút ở pH 7,5 và nhiệt độ là 37°C.

Hoạt tính đặc hiệu của protease được biểu thị bằng U/mg protein: Hoạt tính đặc hiệu = Hoạt tính enzyme/Hàm lượng protein [20].

Định danh dòng vi khuẩn có khả năng sinh protease cao nhất, mẫu được phân tích tại Trung tâm Xét nghiệm kỹ thuật cao KTEST (thành phố Hồ Chí Minh), khuẩn lạc được tách chiết DNA bằng bộ hóa chất QIAamp DNA Mini Kit theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Toàn bộ vùng trình tự 16S rRNA (~1.400

bp) được nhân bản bằng cặp mồi đặc hiệu và được giải trình tự bằng phương pháp Sanger. Sử dụng phần mềm BLAST để so sánh trình tự truy vấn với trình tự tham chiếu từ cơ sở dữ liệu 16S rRNA (Bacteria and Archaea type strains).

2.3. Các chỉ tiêu phân tích và xử lý thống kê

Sử dụng phần mềm Microsoft Excel 2013 để xử lý số liệu thô, phần mềm Statgraphics Centurion XV.I được dùng để phân tích phương sai và kiểm định Duncan các trung bình nghiệm thức.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và định danh sơ bộ các dòng vi khuẩn

Phân lập được 48 dòng vi khuẩn có đặc điểm khuẩn lạc và tế bào khác nhau khi quan sát dưới kính hiển vi (Bảng 2)

Bảng 2. Đặc điểm khuẩn lạc và tế bào của các dòng vi khuẩn phân lập

Số dòng vi khuẩn	Mẫu	Đặc điểm khuẩn lạc	Đặc điểm tế bào
Cần Thơ (9 dòng)	Mẫu tương, chao giai đoạn ủ mốc	Hình tròn, bìa nguyên/răng cưa, độ nổi mô/lài, màu trắng đục, kích thước 1,6 mm - 5,8 mm	Que ngắn, kích thước (1,3 - 1,6) x (0,61 - 0,7) μm
Đồng Tháp (12 dòng)	Mẫu chao ủ mốc, chao thành phẩm, tương hạt thành phẩm, tương xay, nước tương trước thanh trùng	Hình tròn/không đều, bìa nguyên/chia thùy, độ nổi lồi, màu trắng đục, kích thước 1 mm - 6 mm	Que dài hoặc que ngắn, kích thước (1,4 - 2,1) x (0,6 - 0,7) μm
Sóc Trăng (13 dòng)	Mẫu tương hạt đang ủ, tương xay thành phẩm, mẫu chao ủ mốc, chao thành phẩm	Hình tròn/không đều, bìa nguyên/răng cưa/chia thùy, màu trắng đục/trắng ngà, kích thước 1 mm - 7 mm	Que dài hoặc que ngắn, kích thước (1,2 - 2,2) x (0,61 - 0,71) μm
Hậu Giang (14 dòng)	Mẫu chao ủ mốc, đậu nành ủ làm nước tương, tương hạt và tương xay thành phẩm	Hình tròn/không đều, bìa nguyên/chia thùy, độ nổi mô/lài, màu trắng đục, kích thước 1 mm - 6 mm	Que dài hoặc que ngắn, kích thước (1,2 - 2,8) x (0,4 - 1,4) μm

Đặc điểm khuẩn lạc và tế bào của 48 dòng vi khuẩn đa dạng phù hợp với mô tả về các dòng vi khuẩn thuộc giống *Bacillus* của Phan Thị Bích Trâm và cs (2019) [18]: Tế bào có hình que ngắn; khuẩn lạc có bìa răng cưa/nguyên, màu trắng đục/vàng, bề mặt nhẵn và khô/ướt (Hình 1).

Sau khi nhuộm gram và quan sát dưới kính hiển vi với vật kính 100X, kết quả cho thấy 48 dòng vi khuẩn *Bacillus* spp. phân lập được đều bắt màu tím xanh của dung dịch crystal violet chứng tỏ các dòng trên đều thuộc vi khuẩn gram dương (Hình 2a).

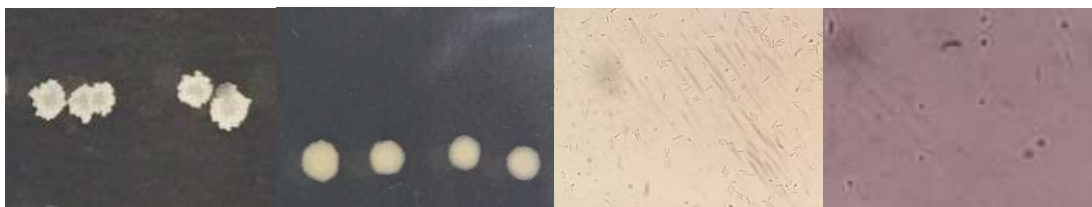
Tiến hành nhuộm bào tử vi khuẩn và quan sát tiêu bản dưới kính hiển vi: các dòng vi khuẩn có bào tử hình bầu dục, nằm giữa hay trong khoảng trung tâm đến gần cuối tế bào (Hình 2b). Mỗi cá thể chỉ tạo một bào tử, bào tử có khả năng chịu nhiệt, tia bức xạ, chất sát khuẩn, chất hút ẩm. Kết quả đạt được tương tự với dòng vi khuẩn *Bacillus subtilis* của Chantawannakula và cs. (2002) [7].

Tất cả các dòng vi khuẩn đều dương tính với catalase (Hình 2c), giống *Bacillus* là vi khuẩn có khả năng dương tính với thuốc thử methyl red (Hình 2d), kết quả quan sát cho thấy cả 48 dòng vi khuẩn đều

biến đổi môi trường thành màu cam hoặc đỏ hay nói cách khác là dương tính với thuốc thử methyl red.

Kết quả kiểm tra đặc tính sinh hóa cho thấy cả 48 dòng vi khuẩn trên đều là gram dương, dương tính với catalase, dương tính với methyl red và tạo

thành bào tử khi quan sát dưới kính hiển vi sau 72 giờ ủ ở 37°C và trữ lạnh 4°C trong 48 giờ (Hình 2). Theo cảm nang phân loại của Barrow và Feltham (1993) [3], các dòng vi khuẩn trên có khả năng thuộc giống *Bacillus*.



Hình 1. Hình dạng khuẩn lạc và tế bào (quan sát với vật kính 100X)

Ghi chú: (a) Khuẩn lạc có hình dạng không đều, màu trắng đục, độ nổi lồi; (b) Khuẩn lạc có dạng hình tròn, màu trắng ngà, độ nổi lồi; (c) Tế bào vi khuẩn có hình que dài; (d) Tế bào vi khuẩn có hình que ngắn.



Hình 2. Một số đặc tính sinh hóa của các dòng vi khuẩn

Ghi chú: (a) Nhuộm gram - có màu xanh tím là gram dương; (b) Nhuộm bào tử - bào tử bắt màu xanh lục; (c) Dương tính với catalase (+), (-) Âm tính với nước cất đối chứng; (d) Dương tính với thuốc thử methyl red, (1) (2) (3) màu đỏ là dương tính, (4) âm tính với đối chứng.

3.2. Khảo sát khả năng sinh protease của vi khuẩn *Bacillus* spp. trên môi trường SMA

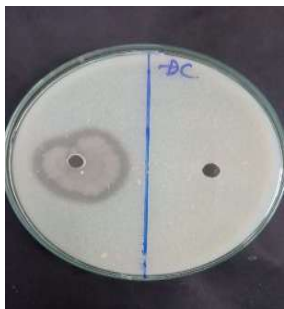
Bảng 3. Khả năng sinh protease của các dòng vi khuẩn trên môi trường SMA

Dòng	Đường kính thủy phân (cm)	Dòng	Đường kính thủy phân (cm)	Dòng	Đường kính thủy phân (cm)
CC1	1,67 ^{mnpq}	DYH2	1,98 ^{ghij}	TUD1	2,23 ^{bc}
CC2	0,97 ^{xy}	HTS1	1,5 ^{qrst}	TUD2	1,27 ^{uv}
CC3	1,7 ^{lmnop}	HTS2	1,67 ^{mnpq}	TUS1	1,4 ^{stw}
CC4	1,3 ^u	HUD1	1,72 ^{klmno}	TUS2	1,33 ^{tuv}
CGH1	2,4 ^{ab}	HUD2	1,82 ^{iklm}	TV1	1,73 ^{klmno}
CGH2	2,43 ^a	HUS1	1,53 ^{pqrs}	TV2	2,2 ^{cde}
CGH3	1,72 ^{klmno}	HUS2	1,57 ^{opqrs}	TV3	2,55 ^a
CMD1	1,1 ^y	HUS3	1,87 ^{ijkl}	TV4	1,1 ^{vwxyz}
CMD2	0,9 ^{vwxyz}	HYH1	1,73 ^{klmno}	TV5	2,08 ^{cdef}
CTD1	2,03 ^{fgghi}	HYH2	2,22 ^{bcd}	TXD1	1,88 ^{hijk}
CTD2	1,77 ^{klmn}	HYH3	2,5 ^a	TXD2	2,18 ^{cde}
CTS1	1,23 ^{uvw}	MGH1	1,48 ^{rst}	TXS1	1,6 ^{nopqr}
CTS2	1,7 ^{lmnop}	MGH2	2,05 ^{defg}	TXS2	1,07 ^{wxyz}
CUS2	1,4 ^{stw}	MGH3	0,97 ^{xy}	UGH1	1,82 ^{iklm}
CUS3	1,5 ^{qrst}	TCD1	2,07 ^{cdef}	UGH2	1,88 ^{hijk}
DYH1	1,75 ^{klmn}	TCD2	2,45 ^a	XYH	1,53 ^{pqrs}

Ghi chú: Số liệu trong bảng là trung bình của 3 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 kiểm định Duncan ($P\text{-value} < 0,05$).

SMA là môi trường chứa sữa đã được tách chất béo, được sử dụng để kiểm tra quá trình đồng tụ và phân giải protein. Vi khuẩn có khả năng phân giải protein sẽ thủy phân casein thành các hợp chất nitrogen hòa tan với biểu hiện là có sự hình thành vòng trong suốt (vòng halo). Sau khi ủ ở 37°C từ 24 giờ - 48 giờ, tất cả 48 dòng vi khuẩn đều tạo vòng halo trên môi trường sữa.

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, cả 48 dòng vi khuẩn *Bacillus* spp. phân lập được đều có khả năng phân giải trên môi trường SMA, trong đó các dòng vi khuẩn CGH1, CGH2, HYH3, TCD2 và TV3 tạo vòng halo với đường kính lớn, khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với các dòng còn lại và khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê với nhau. Kết quả đạt được phù hợp với các dòng vi khuẩn thuộc giống *Bacillus* có khả năng phân giải protein trên môi trường sữa trong nghiên cứu của Kazanas (1968) [11]. Sử dụng phương pháp tương tự để xác định hoạt tính protease, Chantawannakula và cs (2002) [7] đã xác định được dòng *Bacillus subtilis* 38 phân lập được tạo vòng halo với đường kính là 2,19 cm. Mỗi dòng vi khuẩn khác nhau có khả năng phân giải mạnh yếu khác nhau, đường kính vòng halo càng lớn chứng tỏ khả năng tiết protease càng nhiều, vì thế 5 dòng vi khuẩn CGH1, CGH2, HYH3, TCD2 và TV3 được xác định là các dòng có khả năng sinh protease mạnh nhất trên môi trường SMA và các dòng này được lựa chọn để thực hiện thí nghiệm kế tiếp.



Hình 3. Vòng halo tạo thành do protease của dòng TV3 trên môi trường SMA

3.3. Tuyển chọn dòng vi khuẩn *Bacillus* spp. có khả năng sinh protease ở môi trường lỏng

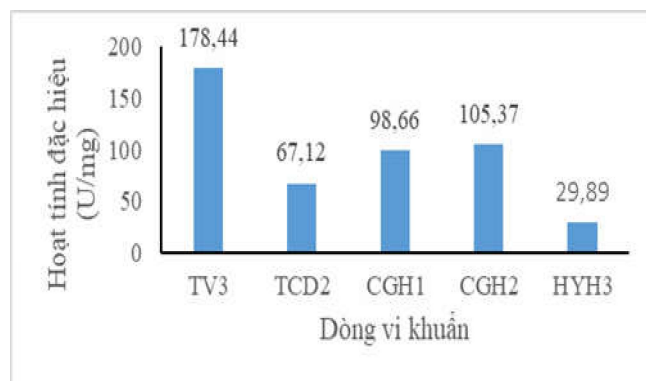
Từ 5 dòng vi khuẩn của thí nghiệm trên, tiến hành thí nghiệm tuyển chọn dòng vi khuẩn có khả năng sinh protease cao nhất ở môi trường lên men lỏng. Sau 48 giờ, thu lấy dịch lên men và tiến hành phân tích hoạt độ enzyme, kết quả được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Hàm lượng protein, hoạt tính protease và hoạt tính đặc hiệu của 5 dòng vi khuẩn

Dòng	Hàm lượng protein (mg/mL)	Hoạt tính protease (U/mL)	Hoạt tính đặc hiệu (U/mg)
TV3	0,273 ^{ab}	48,73 ^a	178,44 ^a
TCD2	0,259 ^b	17,36 ^b	67,12 ^{bc}
CGH1	0,157 ^c	15,49 ^b	98,66 ^b
CGH2	0,159 ^c	16,8 ^b	105,37 ^b
HYH3	0,312 ^a	9,33 ^b	29,89 ^c

Ghi chú: Như bảng 3.

Cả 5 dòng vi khuẩn đều có khả năng sinh protease ở môi trường lên men lỏng. Kết quả cho thấy, dòng vi khuẩn HYH3 có hàm lượng protein cao nhất (0,312 mg/mL) khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê với dòng TV3 (0,273 mg/mL) và khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với các dòng vi khuẩn còn lại. Theo Nguyễn Châu Sang và Nguyễn Thị Hà (2014) [16] về tinh sạch và khảo sát của protease chịu kiềm, dòng vi khuẩn *Bacillus* sp. SV1 phân lập được có hàm lượng protein là 0,18 mg/mL; Afifah và cs. (2014) [1] xác định được hàm lượng protein của dòng vi khuẩn *Bacillus pumilus* 2.g là 153,5 mg/mL trong nghiên cứu về tinh sạch và xác định đặc tính của fibrinolytic enzyme từ vi khuẩn *Bacillus pumilus* 2.g phân lập từ gembus.



Hình 4. Hoạt tính đặc hiệu (U/mg) của 5 dòng vi khuẩn

Hoạt tính protease của dòng TV3 cao nhất đạt 48,73 U/mL khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với các dòng vi khuẩn còn lại, dòng HYH3 có hoạt tính protease thấp nhất (9,33 U/mL). Hoạt tính protease thô thu được từ dòng *Bacillus mojavensis* (2,43 U/mL) trong nghiên cứu của Rajesh và cs (2005) [19] về protease ngoại bào chịu kiềm từ

Bacillus sp. phân lập, hoạt tính protease của dòng *Bacillus* CEMB 10370 trong nghiên cứu của Khan và cs (2011) [12] về phân lập và sàng lọc vi khuẩn sản xuất protease chịu kiềm là 0,7 U/mL. Kết quả đạt được có sự khác biệt vì ở mỗi dòng vi khuẩn khác nhau thì khả năng sinh protease có hoạt tính khác nhau phụ thuộc vào loài vi khuẩn, thành phần môi trường lên men và các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men như nhiệt độ, thời gian,...

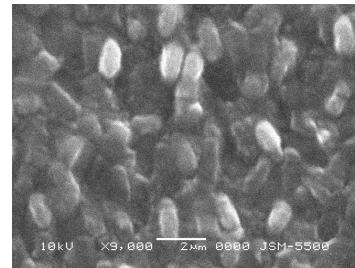
Hoạt tính đặc hiệu của enzyme cho phép ước tính hoạt động của enzyme trên mỗi milligram protein hoàn chỉnh, đây là thước đo cho sản phẩm được tạo thành bởi một enzyme trong khoảng thời gian và điều kiện nhất định trên mỗi milligram protein [14], hoạt tính đặc hiệu của protease thể hiện độ tinh khiết của protease vì thế dòng vi khuẩn nào có hoạt tính đặc hiệu cao nhất thì được xác định là dòng có khả năng tổng hợp protease cao nhất ở môi trường lên men lỏng. Kết quả từ hình 4 cho thấy, có sự chênh lệch về hoạt tính đặc hiệu giữa 5 dòng vi khuẩn, hoạt tính đặc hiệu của dòng TV3 được xác định là 178,44 U/mg cao hơn và khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với các dòng vi khuẩn còn lại. Hoạt tính đặc hiệu của enzyme thô do dòng vi khuẩn *B. subtilis* tổng hợp đạt 808 U/mg trong nghiên cứu của Safey và Raouf (2004) [20] về sản xuất, tinh sạch và xác định đặc tính của protease từ *B. subtilis*; Borkar (2018) [5] nghiên cứu tinh sạch protease chịu kiềm từ *B. subtilis*, tiến hành khảo sát hoạt tính đặc hiệu của enzyme thô từ dịch lên men trong môi trường lỏng của *B. subtilis* kết quả đạt được 3,3 U/mg. Dòng vi khuẩn TV3 là dòng được tuyển chọn có khả năng tổng hợp protease cao nhất trong các dòng đã phân lập, tiến hành định danh đến loài dòng vi khuẩn này.

Bảng: Danh sách 10 kết quả Blast phù hợp nhất

No.	Scientific Name	Mis.	Gap.	Query Cover	Per. Ident	Acc. Len	Accession
1	<i>Bacillus subtilis</i>	1	0	100	99.93	1517	NR_027552.1
2	<i>Bacillus subtilis</i>	1	0	100	99.93	1472	NR_113265.1
3	<i>Bacillus subtilis</i>	1	0	100	99.93	1475	NR_112629.1
4	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	2	0	100	99.86	1550	NR_102783.2
5	<i>Bacillus subtilis</i>	2	0	100	99.86	1550	NR_112116.2
6	<i>Bacillus tequilensis</i>	2	0	100	99.86	1456	NR_104919.1
7	<i>Bacillus subtilis</i>	2	0	100	99.86	1468	NR_116017.1
8	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	2	0	100	99.86	1538	NR_104873.1
9	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	3	0	100	99.78	1475	NR_112686.1
10	<i>Bacillus mojavensis</i>	4	0	100	99.71	1407	NR_118290.1

Hình 5. Kết quả so sánh trình tự 16S rRNA của dòng TV3 với cơ sở dữ liệu 16S rRNA của phần mềm BLAST (30/12/2020)

Định danh dòng TV3 theo phương pháp giải trình tự, trình tự được giải gồm 1393 bps, tiến hành truy vấn trên cơ sở dữ liệu 16S rRNA (Bacteria and Archaea type strains) cập nhật vào ngày 30/12/2020. Kết quả cho thấy trình tự 16S rRNA của dòng TV3 có độ tương đồng 99,93% với trình tự 16S rRNA của *Bacillus subtilis* (NR027552.1) (Hình 5 và 6). *Bacillus subtilis* là vi khuẩn quan trọng để sản xuất protease ứng dụng trong công nghiệp và y học [2], do đó dòng TV3 có tiềm năng lớn trong sản xuất protease.



Hình 6. Tế bào của dòng vi khuẩn TV3 được chụp dưới kính hiển vi điện tử quét

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu cho thấy, có 48 dòng vi khuẩn được phân lập từ sản phẩm đậu nành lên men tại Cần Thơ, Đồng Tháp, Sóc Trăng và Hậu Giang. Định danh sơ bộ dựa vào đặc điểm hình thái tế bào, hình thái khuẩn lạc và đặc tính sinh hóa cho thấy, các dòng vi khuẩn trên thuộc giống *Bacillus*. Tất cả các dòng vi khuẩn đều có khả năng sinh protease trên môi trường SMA, trong đó các dòng TV3, TCD2, CGH1, CGH2 và HYH3 tạo vòng halo lớn hơn các dòng vi khuẩn còn lại. Dòng TV3 có hoạt tính đặc hiệu cao nhất (178,44 U/mg), vì thế xác định TV3 là dòng vi khuẩn có khả năng sinh protease cao nhất ở môi trường lên men lỏng, kết quả định danh bằng phương pháp giải trình tự cho thấy TV3 thuộc loài *Bacillus subtilis*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Afifah, D. N., M. Sulchan, D. Syah, Yanti, M. T. Suhartono and J. H. Kim (2014). Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus pumilus* 2.g isolated from Gembus, an Indonesian Fermented Food. *Prev. Nutr. Food Sci.*, 19 (3): 213 - 219.
2. Aguilar, J. G. S. and H. H. Satto (2018). Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Research International*, 103: 253 - 262.

3. Barrow, G.I. and R. K. A. Feltham (1993). Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria, third edition. *Cambridge University Press. Cambridge*. 355 pages.
4. Bhaskar, N., E. S. Sudeepa, H. N. Rashmi and A. T. Selvi (2007). Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus* CFR3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities. *Bioresour. Technol.*, 98: 2758 - 2764.
5. Borkar, P. S (2018). Purification and immobilization of thermostable serine alkaline protease from *Bacillus subtilis*. *The Pharma Innovation Journal*, 7(5): 622 - 626.
6. Bradford, M. M (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram. *Analytical biochemistry*, 72: 248 - 254.
7. Chantawannakula, P., A. Oncharoen, K. Klanbuta, E. Chukeatiroteb and S. Lumyonga (2002). Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand. *Science Asia*, 28: 241 - 245.
8. Das, G. and M. P. Prasad (2010). Isolation, purification & mass production of protease enzyme from *Bacillus subtilis*. *International Research Journals of microbiology*, 1(2): 26 - 31.
9. Hanan, S. A (2012). Isolation and screening of extracellular proteases produced by new Isolated *Bacillus* sp. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2 (9): 071 - 074.
10. Huy, D. N. A., P. A. Hao and P. V. Hung (2016). Screening and identification of *Bacillus* sp. isolated from traditional Vietnamese soybean fermented products for high fibrinolytic enzyme production. *International Food Research Journal*, 23(1): 326 - 331.
11. Kazanas, N. (1968). Proteolytic activity of microorganisms isolated from freshwater fish. *Applied microbiology*, 16: 128 - 132.
12. Khan, M. A., N. Ahmad, U. A. Zafar, I. A. Nasir and M. A. Qadir (2011). Isolation and screening of alkaline protease producing bacteria and physio - chemical characterization of the enzyme. *Afr. J. Biotech.*, 10 (33): 6203 - 6212.
13. Kunitz, M. (1947). Crystalline soyabean trypsin inhibitor: II. General properties. *Gen. Physiol.*, 30: 291 - 310.
14. Mega, O., C. Sumantri, I. I. Arief and C. Budiman (2020). Purification and proteolytic activity of caseinolytic protease (Clp) from *Lactobacillus plantarum* IIA - 1AS. *International Conference of Science and Applied Science*, 020046: 1 - 8.
15. Mienda, B. S., A. Yahya, I. A. Galadima and M. S. Shamsir (2014). An overview of microbial proteases for industrial applications. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5 (1): 388 - 396.
16. 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*, 35: 48 - 55.
17. Ogbadu, L. J., R. N. Okagbue and A. A. Ahmad (1990). Glutamic acid production by *Bacillus* isolates from Nigerian fermented vegetable proteins. *World J Microbiol Biotechnol*, 6: 377 - 82.
18. Phan Thị Bích Trâm, Lương Thị Thu Hương, Khúc Ngọc Vy (2019). Sản xuất protease từ *Bacillus subtilis* N1 sử dụng phụ phẩm đậu nành. *Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Cần Thơ*, 55 (6B): 30 - 37.
19. Rajesh, P., M. Dodia and S. P. Singh (2005). Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: Production and optimization. *Proc. Biochem*, 40: 3569 - 3575.
20. Safey, E. M. E. and U. M. A. Raouf (2004). Production, purification and characterization of protease enzyme from *Bacillus subtilis*. *International Conferences For Development and The Environment In The Arab World, Assiut Univ.*, 2 - 25.
21. Sharmin, F and M. Rahman (2007). Isolation and characterization of protease producing *Bacillus* strain FS - 1 F. *Agricultural Engineering International: the CIGR Ejournal*, 06 (009), pp 9.
22. Trương Thị Minh Hạnh, Nguyễn Thị Minh Nguyệt, Văn Hà Vy, Võ Viết Lai (2016). Nghiên cứu phân lập, định danh và chọn lọc chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis natto* có khả năng sinh enzyme nattokinase từ natto thương phẩm. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đà Nẵng*, 9 (106): 73 - 77.

**ISOLATION AND SELECTION *Bacillus* sp. TO BE ABLE TO SYNTHESIS PROTEASE
FROM FERMENTED SOYBEAN PRODUCTS**

**Le Thi Ngoc Han^{1,2}, Trinh Thi Tuyet Hoa²,
Vo Thi Ngoc Diep², Nguyen Van Thanh²**

¹*Can Tho Technical Economic College*

²*Biotechnology Research and Development Institute, Can Tho University*

Summary

This study was carried out to isolated and selected *Bacillus subtilis*, which has synthesis highly special activity protease in submerged fermentation. The ability of protease production of these strains was investigated by measuring hydrolysis diameter on Skim milk agar (SMA) and submerged fermentation (SmF). From the fermented soybean products were collected in Can Tho city and some provinces such as Dong Thap, Soc Trang and Hau Giang, 48 bacteria strains were isolated, the results of preliminary identification based on morphological (Cell and colony) and biochemical (Gram staining, spore production, catalase production and methyl red test) characteristics. The result showed all bacteria strains belong to genus *Bacillus*. Both of the strains resolved SMA, 5 bacterial strains created halo larger than the others. TV3 was the best synthesis protease strain in submerged fermentation at 48 hours, 37°C and pH 7.2 with protease activity reached 48.73 U/mL and specific activity reached 178.44 U/mg. TV3 was identification by Sanger sequencing of the 16S rRNA region and compared with database of BLAST software. The result determined TV3 belong to *Bacillus subtilis* had similarity 99.93% with 16S rRNA sequence of *Bacillus subtilis* (NR027552.1).

Keywords: *Bacillus subtilis*, protease, TV3.

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Thị Việt Anh

Ngày nhận bài: 07/01/2022

Ngày thông qua phản biện: 7/02/2022

Ngày duyệt đăng: 14/02/2022