

# TUYỂN CHỌN VI KHUẨN *Bacillus* spp. SINH ENZYME $\beta$ -GALACTOSIDASE VÀ XÁC ĐỊNH ĐIỀU KIỆN THÍCH HỢP CHO QUÁ TRÌNH LÊN MEN LACTOSE

Lê Huỳnh Bằng Nguyễn, Nguyễn Như Quỳnh, Nguyễn Thị Hạnh,

Lưu Minh Châu, Nguyễn Ngọc Thạnh và Huỳnh Xuân Phong\*

Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ, Việt Nam

\*Tác giả liên hệ: Huỳnh Xuân Phong, hxphong@ctu.edu.vn

## Lịch sử bài báo

Ngày nhận: 14/4/2024; Ngày nhận chỉnh sửa: 19/6/2024; Duyệt đăng: 25/6/2024

## Tóm tắt

Nghiên cứu được thực hiện nhằm tuyển chọn các chủng *Bacillus* spp. có khả năng sinh enzyme  $\beta$ -galactosidase và xác định nhiệt độ, pH thích hợp cho môi trường lên men lactose. Trong 21 chủng *Bacillus* spp. được khảo sát bằng phương pháp sử dụng X-gal, 6 chủng (B6, B7, B9, B11, B17 và B18) có khả năng sinh enzyme  $\beta$ -galactosidase thông qua hiển thị màu xanh đặc trưng của X-gal trên khuẩn lạc sau 72 giờ. Tuyển chọn được 4 chủng (B6, B9, B17 và B18) hiển thị màu xanh đậm nhất để tiếp tục xác định hoạt tính enzyme bằng phương pháp sử dụng cơ chất ortho-nitrophenyl- $\beta$ -galactoside (ONPG). Kết quả cho thấy chủng B18 thể hiện hoạt tính enzyme cao nhất nên được định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử và được xác định là *Bacillus licheniformis*. Điều kiện lên men môi trường chứa lactose của chủng *B. licheniformis* B18 cũng được xác định ở nhiệt độ 30°C và pH 7,0 cho hoạt tính enzyme đạt giá trị cao nhất là 533,08 U/L. Chủng *B. licheniformis* B18 được định hướng tiếp tục nghiên cứu tối ưu các nhân tố khác nhằm sản xuất enzyme  $\beta$ -galactosidase.

**Từ khóa:** *Bacillus licheniformis*, lactase, ONPG, X-gal,  $\beta$ -galactosidase.

DOI: <https://doi.org/10.52714/dthu.13.8.2024.1351>.

Trích dẫn: Lê, H. B. N., Nguyễn, N. Q., Nguyễn, T. H., Lưu, M. C., Nguyễn, N. T., & Huỳnh, X. P. (2024). Tuyển chọn vi khuẩn *Bacillus* spp. sinh enzyme  $\beta$ -galactosidase và xác định điều kiện thích hợp cho quá trình lên men lactose. *Tạp chí Khoa học Đại học Đồng Tháp*, 13(8), 19-27. <https://doi.org/10.52714/dthu.13.8.2024.1351>.

Copyright © 2024 The author(s). This work is licensed under a CC BY-NC 4.0 License.

# SELECTING $\beta$ -GALACTOSIDASE PRODUCING *Bacillus* spp. AND DETERMINING CONDITIONS FOR LACTOSE FERMENTATION

Le Huynh Bang Nguyen, Nguyen Nhu Quynh, Nguyen Thi Hanh,  
Luu Minh Chau, Nguyen Ngoc Thanh, and Huynh Xuan Phong\*

*Institute of Food and Biotechnology, Can Tho University, Vietnam*

\*Corresponding author: Huynh Xuan Phong, Email: hxphong@ctu.edu.vn

## Article history

Received: 14/4/2024; Received in revised form: 19/6/2024; Accepted: 25/6/2024

## Abstract

The study was conducted to select *Bacillus* spp. strains capable of producing the enzyme  $\beta$ -galactosidase and determine the suitable temperature and pH for lactose fermentation. Among the 21 *Bacillus* spp. strains surveyed using the X-gal method, 6 strains (B6, B7, B9, B11, B17, and B18) showed the characteristic blue color of X-gal on agar plates after 72 hours, indicating the presence of  $\beta$ -galactosidase enzyme. Four strains (B6, B9, B17, and B18) displaying the darkest blue color were selected for further enzyme activity determination using ortho-nitrophenyl- $\beta$ -galactoside (oNPG). The results revealed that strain B18 exhibited the highest enzyme activity and was identified through molecular biological techniques as *Bacillus licheniformis*. The optimal conditions for lactose fermentation by *B. licheniformis* B18 were determined to be at 30°C and pH 7.0, with the enzyme activity reaching the highest value of 533.08 U/L. Strain *B. licheniformis* B18 is recommended for further research to optimize other factors for  $\beta$ -galactosidase production.

**Keywords:** *Bacillus licheniformis*, lactase, ONPG, X-gal,  $\beta$ -galactosidase.

## 1. Đặt vấn đề

Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng khoảng 95% dân số ở châu Á, 20% dân số ở châu Âu và Mỹ, 75% dân số toàn cầu không dung nạp được lactose (Mattar & cs., 2012). Việc không dung nạp được lactose có thể gây ra hạn chế ăn uống khi tiêu thụ các sản phẩm có nguồn gốc từ sữa. Mặt khác, lactose không chỉ có mặt trong các sản phẩm từ sữa mà còn xuất hiện trong các loại thực phẩm khác nhau như thực phẩm đông lạnh (kem, phô mai,...) và thực phẩm chế biến (bánh ngọt, bánh quy, bánh mì,...) (Dominici & cs., 2022). Theo đó, enzyme  $\beta$ -galactosidase (hay còn được biết đến là lactase) là enzyme xúc tác cho quá trình thủy phân lactose thành hai loại đường đơn dễ sử dụng là glucose và galactose (Saqib & cs., 2017). Nhờ khả năng phân giải lactose mà  $\beta$ -galactosidase được xem là đóng vai trò quan trọng đối với sức khỏe của một phần lớn dân số trên thế giới. Nó còn được ứng dụng nhiều trong các công nghiệp khác nhau, bao gồm chế biến sữa (chẳng hạn như thủy phân lactose trong sữa), chế biến thực phẩm (cải thiện hương vị và kết cấu trong một số loại thực phẩm nhất định) và sản xuất dược phẩm (tổng hợp các sản phẩm không chứa lactose và sản xuất các hợp chất dược phẩm). Bên cạnh đó,  $\beta$ -galactosidase còn giúp giảm thiểu ô nhiễm liên quan đến việc xử lý chất thải của ngành công nghiệp sữa bằng cách tạo điều kiện chuyển đổi chất thải sữa giàu lactose thành các sản phẩm dễ phân hủy sinh học hơn (Saqib & cs., 2017).

Enzyme  $\beta$ -galactosidase được tìm thấy trong vi sinh vật, thực vật và cả động vật (Husain, 2010). Tuy nhiên, enzyme  $\beta$ -galactosidase thường được thu nhận vi sinh vật (vi khuẩn, nấm mốc và nấm men) bởi tốc độ tăng trưởng nhanh chóng và có thể sản xuất enzyme một cách hiệu quả (Raveendran & cs., 2018). Trong đó, vi khuẩn *Bacillus* cũng là một trong những nguồn phổ biến trong việc sản xuất enzyme này. Các chủng *Bacillus* được biết đến là có khả năng sinh bào tử với độ ổn định cao và có thể chịu được các điều kiện khắc nghiệt của môi trường để tồn tại ở nhiều mức nhiệt độ và pH khác nhau (Bahaddad & cs., 2023). Bên cạnh đó, nhu cầu dinh dưỡng của *Bacillus* thường khá đơn giản và có thể phát triển trên môi trường rẻ tiền. Chúng có khả năng sản xuất số lượng lớn enzyme, bao gồm cả  $\beta$ -galactosidase nên sẽ có lợi cho các ứng dụng công nghiệp nhằm góp phần tiết kiệm chi phí trong quá trình sản xuất

enzyme (Su & cs., 2020). Ngoài ra, các loài *Bacillus* thường được các cơ quan quản lý coi là an toàn (GRAS) và đây cũng là điều kiện cần thiết để sử dụng trong ngành công nghiệp thực phẩm và dược phẩm (Sewalt & cs., 2016). Trong nghiên cứu này, 21 chủng *Bacillus* trong bộ sưu tập giống của Viện Công nghệ sinh học và Thực phẩm được sử dụng để tuyển chọn các chủng có khả năng sinh enzyme  $\beta$ -galactosidase và định hướng tối ưu hóa môi trường lên men để sản xuất loại enzyme này.

## 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Vật liệu và hóa chất

- Các chủng *Bacillus* (21 chủng) được nghiên cứu thuộc bộ sưu tập giống vi sinh vật của phòng thí nghiệm Vi sinh Công nghiệp, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ. Các chủng này đã được xác định các đặc điểm sinh hóa phù hợp với chi *Bacillus* (Shelef, 2003; Lyngwi & Joshi, 2014).

- Hóa chất: môi trường Nutrient (Himedia, Ấn Độ), lactose (Duchefa, Hà Lan), isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-gal), o-nitrophenol (oNP), o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (oNPG) (Sigma-aldrich, Đức),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Xilong Scientific, Trung Quốc).

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Sàng lọc các chủng *Bacillus* có khả năng sinh enzyme  $\beta$ -galactosidase

Các chủng *Bacillus* được hoạt hóa, tăng sinh trong môi trường Nutrient lỏng (NB) (pH 7,4 $\pm$ 0,2) và ủ lắc 200 vòng/phút ở 37°C trong 36 giờ (mật số khoảng 10<sup>8</sup> CFU/mL). Khả năng sản sinh enzyme  $\beta$ -galactosidase của các chủng *Bacillus* được xác định bằng phương pháp nhỏ dịch nuôi cấy trên đĩa thạch (Kamran & cs., 2016): các đĩa môi trường Nutrient agar (NA) đã được chuẩn bị và 60  $\mu\text{L}$  X-gal nồng độ 20 mg/mL cùng với 10  $\mu\text{L}$  IPTG 0,1M được thêm vào mỗi đĩa và trải đều. Sau đó, các đĩa được khô tự nhiên khoảng 30 phút. Dịch tăng sinh của các chủng *Bacillus* được nhỏ vào giữa đĩa môi trường với thể tích là 3  $\mu\text{L}$ , để khô dịch khuẩn trong 5 phút và đĩa được ủ ở 37°C trong điều kiện tối. Mẫu đối chứng thay thế 3  $\mu\text{L}$  dịch khuẩn bằng 3  $\mu\text{L}$  môi trường NB. Quan sát sự phát triển và sự thay đổi màu sắc của khuẩn lạc trong 24, 48 và 72 giờ. Biểu hiện màu sắc:

không có màu xanh (-) và màu xanh đậm dần được đánh giá theo các dấu (+) tương ứng với từng mức độ sản xuất  $\beta$ -galactosidase của các chủng *Bacillus* (Volford & cs., 2021).

### 2.2.2. Xác định hoạt tính enzyme $\beta$ -galactosidase của các chủng *Bacillus*

Các chủng *Bacillus* được tăng sinh trong môi trường NB và ủ lắ 200 vòng/phút ở 37°C trong 36 giờ (mật số khoảng  $10^8$  CFU/mL). Sau đó, chủng *Bacillus* được lên men trong 5 mL môi trường NB có bổ sung 1% lactose và ủ lắ ở 37°C trong 48 giờ. Sau đó, 1 mL dịch lên men được ly tâm ở 6.000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C. Dịch nổi sau khi ly tâm (enzyme thô) được bảo quản ở 4°C để xác định hoạt tính enzyme  $\beta$ -galactosidase.

Chuẩn bị đường chuẩn oNP: Dung dịch gốc oNP 60 mM được chuẩn bị bằng cách hòa tan hoàn toàn 0,0334 g oNP trong 1 mL dung dịch đệm phosphate 50 mM (pH 7,0) và 3 mL ethanol. Sau đó, hỗn hợp này được ngâm vào bể điều nhiệt ở 45°C. Sử dụng dung dịch đệm phosphate 50 mM để pha loãng dung dịch oNP gốc thành dãy các nồng độ 0,006 - 1,2 mM. Dung dịch đối chứng gồm 1 mL dung dịch đệm phosphate 50 mM và 3 mL ethanol. Đo mật độ hấp thụ ở bước sóng 420 nm (Princely & cs., 2013).

Xác định hoạt tính của enzyme  $\beta$ -galactosidase: Chuẩn bị 480  $\mu$ L dung dịch oNPG 22 mM được pha trong dung dịch đệm phosphate 50 mM (pH 6,5) trong các ống eppendorf 1,5 mL và làm ổn định nhiệt ở 30°C trong 5 phút. Sau đó, 20  $\mu$ L mẫu enzyme thô được bổ sung vào eppendorf và tiếp tục ủ ở 30°C trong 10 phút, tốc độ lắ 600 vòng/phút. Sau 10 phút, 750  $\mu$ L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,4 M được cho vào ống eppendorf để kết thúc phản ứng enzyme. Đo mật độ hấp thụ ở bước sóng 420 nm. Một đơn vị hoạt độ của  $\beta$ -galactosidase được định nghĩa là lượng enzyme giải phóng 1  $\mu$ mol oNP/1 phút trong các điều kiện phản ứng nêu trên (Nguyen & cs., 2006).

Hoạt tính enzyme  $\beta$ -galactosidase có trong 1 mL dịch nuôi cấy được tính theo công thức sau:

$$H = \frac{\text{OD mẫu} - \text{OD đối chứng}}{a} \times \frac{1}{t} \times \frac{\text{Venzyme} + \text{VoNPG}}{\text{Venzyme}} \times d$$

Trong đó: H là hoạt tính enzyme  $\beta$ -galactosidase (U/mL), OD mẫu là độ hấp thụ quang của mẫu phản ứng màu ở bước sóng 420 nm, OD đối chứng là độ hấp thụ quang của mẫu đối chứng, a là hệ số góc của

đường chuẩn oNP, t là thời gian phản ứng enzyme cơ chất (phút), Venzyme là thể tích enzyme đã sử dụng (mL), VoNPG là thể tích oNPG đã sử dụng (mL) và d là độ pha loãng enzyme.

### 2.2.3. Định danh chủng *Bacillus* sp. có hoạt tính enzyme $\beta$ -galactosidase

Chủng *Bacillus* có khả năng sinh enzyme  $\beta$ -galactosidase với hoạt tính cao nhất được định danh bằng phương pháp sinh học phân tử. Xác định trình tự gen 16S rRNA của chủng *Bacillus* bằng cặp môi 27F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1495R (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3') (Weisburg & cs. 1991).

Sử dụng công cụ BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) để so sánh mức độ tương đồng của chuỗi trình tự vùng 16S rRNA gene với với các trình tự gen đã được công bố tại ngân hàng gene của NCBI (National Center for Biotechnology Information) để xác định tên loài của chủng vi khuẩn.

### 2.2.4. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ và pH môi trường đến hoạt tính enzyme $\beta$ -galactosidase

Chủng *Bacillus* sp. được tăng sinh trong môi trường NB và ủ lắ 200 vòng/phút ở 37°C trong 36 giờ (mật số khoảng  $10^8$  CFU/mL). Sau đó, chủng *Bacillus* sp. được sử dụng để lên men trong 5 mL môi trường NB có bổ sung 1% lactose trong 48 giờ với 3 mức pH môi trường (6,0, 6,5 và 7,0) và 2 mức nhiệt độ ủ (30°C và 37°C), tốc độ lắ 200 vòng/phút. Sau đó, 1 mL dịch lên men được ly tâm ở 6.000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C. Dịch nổi sau khi ly tâm (chứa enzyme thô) được bảo quản ở 4°C để xác định hoạt tính enzyme  $\beta$ -galactosidase tương tự như thí nghiệm 2.2.2.

### 2.2.5. Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

Kết quả được xử lý và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, Hoa Kỳ). Số liệu được xử lý và phân tích bằng phần mềm thống kê Statgraphics Centurion XV (Statpoint Technologies Inc., Hoa Kỳ).

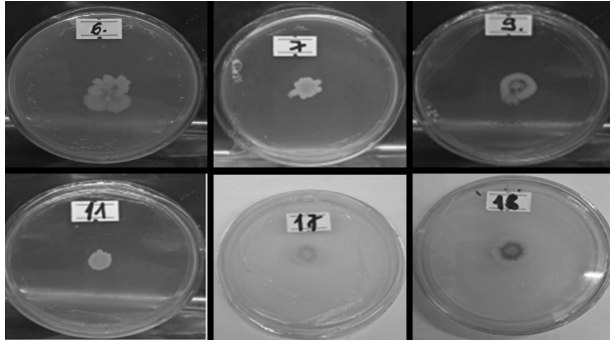
## 3. Kết quả và thảo luận

### 3.1. Khả năng sinh enzyme $\beta$ -galactosidase các chủng *Bacillus* spp.

Dựa trên nguyên tắc enzyme  $\beta$ -galactosidase thủy phân X-gal và tạo thành sản phẩm kết tủa dichloro-dibromo-indigo màu xanh không tan trong nước khi được cảm ứng bởi IPTG. Các chủng



*Bacillus* spp. trong bộ sưu tập giống được nghiên cứu để sàng lọc những chủng có khả năng sinh enzyme  $\beta$ -galactosidase bằng phương pháp nuôi cấy trên đĩa thạch có bổ sung X-gal và IPTG. Kết quả biểu hiện màu sắc của các chủng *Bacillus* spp. trên đĩa thạch được thể hiện qua Hình 1 và mức độ biểu hiện khả năng sinh enzyme cao cũng được trình bày trong Bảng 1.



**Hình 1. Kết quả kiểm tra khả năng sinh enzyme  $\beta$ -galactosidase của các chủng *Bacillus* spp. trên đĩa thạch**

**Bảng 1. Mức độ biểu hiện khả năng sinh enzyme  $\beta$ -galactosidase của các chủng *Bacillus* spp. theo thời gian**

Chủng <i>Bacillus</i> spp.	Thời gian nuôi cấy (giờ)		
	24	48	72
B6	-	++	+++
B7	-	+	++
B9	-	+++	++++
B11	-	++	++
B17	-	++	+++
B18	-	++++	+++++

Ghi chú: Dấu (-) thể hiện không sinh enzyme, dấu (+) thể hiện mức độ sinh enzyme thông qua quan sát hình thành mức độ màu xanh của khuẩn lạc vi khuẩn

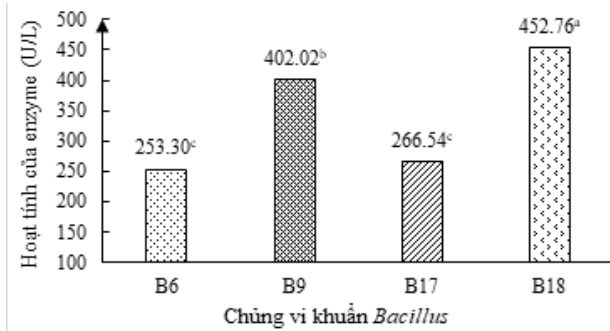
Trong 21 chủng *Bacillus* spp. thuộc bộ sưu tập giống của phòng thí nghiệm đã sàng lọc được 6 chủng *Bacillus* spp. có khả năng sinh enzyme  $\beta$ -galactosidase do có hiện thị màu xanh đặc hiệu trên đĩa thạch nơi khuẩn lạc phát triển, các chủng còn lại không có sự biểu hiện màu sắc cụ thể. Từ Bảng 1 có thể thấy sau 24 giờ ủ ở 37°C thì các chủng *Bacillus* spp. chỉ phát triển khuẩn lạc trên môi trường NB. Tuy nhiên, sau 48 giờ ủ thì tại vị trí khuẩn lạc bắt đầu có sự xuất hiện màu do sự thủy phân X-gal bởi hoạt động của enzyme  $\beta$ -galactosidase. Sau 72 giờ ủ, có thể nhận thấy sự thay đổi màu sắc tại khuẩn

lạc có xu hướng đậm hơn. Trong đó, 4 chủng (B6, B9, B17, B18) có màu xanh đậm được coi là các chủng vi khuẩn có khả năng sinh  $\beta$ -galactosidase cao. Chủng có màu sắc đậm nhất là chủng B18. Do đó, 4 chủng này được sử dụng để xác hoạt tính enzyme ở thí nghiệm tiếp theo.

Nhìn chung, tỷ lệ các chủng có khả năng sinh enzyme  $\beta$ -galactosidase của nghiên cứu này chiếm khoảng 28,57%. Trong một số nghiên cứu trước đây cho thấy tỷ lệ sàng lọc có thể cao hoặc thấp hơn tỷ lệ này. Cụ thể, trong nghiên cứu của Elsayed & cs. (2019) đã thu được 9 chủng vi khuẩn trong số 22 chủng phân lập từ các mẫu đất Ai Cập (chiếm 40,91%) thể hiện hoạt tính của enzyme  $\beta$ -galactosidase. Kết quả nghiên cứu của Rehamnia & cs. (2022) cũng đã xác định được 24 chủng trong 250 chủng phân lập từ trầm tích của hang động ở Algerian (chiếm 9,6%) có khả năng sinh tổng hợp enzyme  $\beta$ -galactosidase. Một nghiên cứu khác gần đây cũng đã tiến hành sàng lọc các chủng vi khuẩn *Bacillus* để sản xuất enzyme  $\beta$ -galactosidase từ 100 chủng phân lập từ các mẫu sữa và phô mai. Thông qua kết quả định tính trên đĩa thạch có chứa X-gal đã nhận thấy có 13 chủng biểu hiện sự hoạt động của enzyme (chiếm 13%) (Amin & Ali, 2023). Từ các kết quả cho thấy sự đa dạng của các chủng vi khuẩn có đặc tính sinh enzyme  $\beta$ -galactosidase còn phụ thuộc vào nguồn gốc phân lập.

### 3.2. Xác định hoạt tính enzyme $\beta$ -galactosidase của các chủng *Bacillus*

Trong số 6 chủng *Bacillus* spp. có khả năng sinh enzyme  $\beta$ -galactosidase thì 4 chủng B6, B9, B17, B18 được chọn để xác định hoạt tính enzyme do có phản ứng màu xanh đặc trưng nhất với X-gal. Hoạt tính của enzyme  $\beta$ -galactosidase được xác định dựa trên phản ứng của enzyme này với cơ chất oNPG và dưới tác dụng của  $\beta$ -galactosidase, oNPG sẽ bị thủy phân thành galactose và oNP (màu vàng và được hấp thụ ở bước sóng cực đại 420 nm). Do đó, hoạt tính enzyme  $\beta$ -galactosidase của các chủng *Bacillus* spp. được xác định dựa trên đường chuẩn oNP (0,006 - 1,2 mM) có phương trình tuyến tính  $y = 1,8884x + 0,028$  với  $R^2 = 1$  và kết quả hoạt tính enzyme của chủng B6, B9, B17 và B18 được thể hiện ở Hình 2.



**Hình 2. Hoạt tính enzyme  $\beta$ -galactosidase của 4 chủng vi khuẩn *Bacillus***

Kết quả sau 48 giờ nuôi cấy trong môi trường NB có bổ sung lactose, hoạt tính enzyme  $\beta$ -galactosidase ngoại bào của 4 chủng *Bacillus* spp. nằm trong khoảng 253,30 - 452,76 U/L. Trong đó, chủng B18 có hoạt tính cao nhất (452,76 U/L). Chủng B6 có hoạt tính thấp nhất (253,30 U/L) nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với chủng B17 (266,54 U/L). Kết quả này cũng phù hợp với kết quả định tính trong thí nghiệm trên khi chủng B18 cho kết quả màu xanh đậm nhất trong số các chủng được khảo sát. So sánh hoạt tính của enzyme trong nghiên cứu này với nghiên cứu trước đây của Nguyễn & cs. (2021) cho thấy kết quả này cũng có sự tương đồng. Cụ thể là trong nghiên cứu của Nguyễn & cs. (2021) thì hoạt tính của enzyme  $\beta$ -galactosidase ngoại bào của các chủng vi khuẩn lactic cao nhất lần lượt là 685,95 U/L, 498,92 U/L và 492,23 U/L tương ứng với các chủng RGH7.1, RGH6.11 và RGH8.8. Các chủng còn lại có hoạt tính enzyme thấp hơn nhiều và nằm trong khoảng từ 50,43 - 170,7 U/L (Nguyễn & cs., 2021).

Enzyme  $\beta$ -galactosidase là enzyme có mặt trong nhiều loại sinh vật bao gồm thực vật, động vật và vi sinh vật. Không chỉ vi khuẩn có khả năng sinh enzyme này mà các vi sinh vật khác như nấm men hay nấm mốc cũng có khả năng sản xuất enzyme  $\beta$ -galactosidase. Theo nghiên cứu của Al-Jazairi & cs. (2014), trong số các chủng nấm men đã được phân lập từ sữa tươi, phô mai, sữa chua và váng sữa ở Syria thì chủng *Kluyveromyces* DIYS 11 được phát hiện có hoạt tính enzyme cao nhất với 335 U/mL và chủng *Kluyveromyces* DIYS 24 có hoạt tính enzyme thấp nhất là 47 U/mL (Al-Jazairi & cs., 2014). Trong nghiên cứu Volford & cs. (2021), 99 chủng nấm mốc thuộc các chi *Lichtheimia*, *Mortierella*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Rhizopus* và *Umbelopsis* đã được sàng lọc dựa trên khả năng sinh  $\beta$ -galactosidase và 10

chủng thể hiện hoạt tốt nhất đã được chọn. Trong đó, *U. longicollis*, *L. hyalospora* và *R. pusillus* có hoạt tính cao nhất trung bình lần lượt là 48, 505 và 860 U/mL khi lên men trong môi trường có bổ sung lactose (Volford & cs., 2021). Từ các kết quả trên, có thể thấy rằng mỗi nhóm vi sinh vật hay mỗi loài trong cùng 1 chủng cũng biểu hiện khác nhau về khả năng sinh enzyme  $\beta$ -galactosidase.

### 3.3. Định danh chủng *Bacillus* sp. được tuyển chọn

Dựa trên kết quả thể hiện hoạt tính của enzyme thông qua quá trình thủy phân oNPG thành oNP, chủng B18 được giải trình tự bằng cặp mồi 27F và 1492R tại vùng gen 16S rRNA. Sử dụng công cụ Nucleotide BLAST để so sánh trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng *Bacillus* sp. B18 với các trình tự trong cơ sở dữ liệu của NCBI, kết quả cho thấy trình tự 16S rRNA của dòng vi khuẩn này có độ tương đồng 98,39% và độ bao phủ 98% với trình tự của chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* (KF737355.1).

*Bacillus licheniformis* là một trực khuẩn Gram dương, có nội bào tử hình bầu dục ở gần trung tâm. Khuẩn lạc trên môi trường có màu trắng, bìa chia thùy, mô nổi, bề mặt nhẵn, đường kính trung bình nằm trong khoảng 2 - 6 mm sau 24 - 48 giờ nuôi cấy (Logan & cs., 2011; Ghani & cs., 2013; Sonune & Garode, 2018). Với khả năng hình thành nội bào tử của *B. licheniformis* đã giúp nó tồn tại trong môi trường khắc nghiệt và đây được xem là một lợi thế lớn của chủng này trong việc ứng dụng nó để sản xuất enzyme. Trong nhiều nghiên cứu cũng cho thấy *B. licheniformis* là chủng có khả năng sinh enzyme  $\beta$ -galactosidase cao nhất trong số các chủng vi khuẩn được phân lập. Điều này đã được ghi nhận trong nghiên cứu của Elsayed & cs. (2019) và Kuribayashi & cs. (2021). Bên cạnh đó, theo như kết quả nghiên cứu của Juajun & cs. (2011) thì  $\beta$ -galactosidase từ *B. licheniformis* có tính ổn định và triển vọng tốt hơn so với các enzyme được sử dụng trong công nghiệp. Khi so sánh với các sản phẩm enzyme tương đương trên thị trường thì  $\beta$ -galactosidase được tinh chế từ việc tối ưu hóa quá trình lên men *B. licheniformis* ALSZ2 được cho là rẻ hơn đáng kể mà vẫn mang lại hiệu quả tương ứng (Amin & Ali, 2023).

### 3.4 Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH đến hoạt tính enzyme $\beta$ -galactosidase của chủng *Bacillus licheniformis* B18

Quá trình sinh tổng hợp enzyme  $\beta$ -galactosidase của vi khuẩn *Bacillus* có thể bị ảnh hưởng bởi một số yếu tố khác nhau như nhiệt độ, độ pH, nguồn carbon, nguồn nitrogen hay bởi chất kích thích như lactose. Trong thí nghiệm này, sự ảnh hưởng của nhiệt độ và pH của môi trường lên men đến hoạt tính của enzyme  $\beta$ -galactosidase được khảo sát và kết quả được trình bày trong Bảng 2. Hoạt tính enzyme  $\beta$ -galactosidase của chủng *B. licheniformis* B18 ở các mức nhiệt độ và pH khảo sát dao động trong khoảng 397,16 - 533,08 U/L. Trong đó, môi trường ban đầu ở mức pH 7,0 và ở nhiệt độ 30°C ghi nhận hoạt tính enzyme cao nhất (533,08 U/L) và có khác biệt ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại. Kết quả này có sự tương đồng với kết quả nghiên cứu của Akcan (2018) khi tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy để sản xuất  $\beta$ -galactosidase từ *B. licheniformis* ATCC 12759 trong quá trình lên men ở trạng thái rắn. Quá trình ghi nhận kết quả cho thấy khả năng sản xuất enzyme tối đa ở pH 7,0. Độ pH của môi trường lên men đóng một vai trò quan trọng trong việc gây ra những biến đổi về mặt hình thái của vi sinh vật và cũng như trong quá trình tiết enzyme. Tuy nhiên, nhiệt độ tối ưu cho quá trình sinh enzyme  $\beta$ -galactosidase với hoạt tính cao là 37°C và nguyên nhân có thể do bản chất ưa nhiệt của loài *B. licheniformis* ATCC 12759 (Akcan, 2018).

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH môi trường đến hoạt tính enzyme  $\beta$ -galactosidase

Nhiệt độ (°C)	pH	Hoạt tính enzyme (U/L)
30	6,0	421,87 <sup>b</sup>
	6,5	423,64 <sup>b</sup>
	7,0	533,08 <sup>a</sup>
37	6,0	438,64 <sup>b</sup>
	6,5	397,16 <sup>b</sup>
	7,0	436,00 <sup>b</sup>

*Ghi chú:* Các giá trị trung bình theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 5% ( $p < 0,05$ ).

Mặt khác, trong công bố kết quả của Batra & cs. (2002) thì hoạt tính enzyme tối đa đạt được ở pH ban đầu là 6,8 và nhiệt độ thích hợp cho quá trình sản xuất enzyme là ở 50°C và nguyên nhân có thể là

do chủng *B. coagulans* là chủng ưa nhiệt được phân lập từ suối nước nóng (45 - 90°C) ở Manikaran (Ấn Độ) (Batra & cs., 2002). Jaturapiree & cs. (2012) cũng đã nghiên cứu ảnh hưởng của giá trị pH ban đầu của môi trường đến quá trình sản xuất enzyme được nghiên cứu trong phạm vi pH từ 6,0 - 10,0. Kết quả cho thấy sản lượng enzyme đạt tối đa khi pH đạt 8,5. Bên cạnh đó, các nhiệt độ lên men khác nhau (40 - 60°C) cũng được khảo sát và 50°C được xác định là thích hợp để chủng *Bacillus* sp. B1.1 phát triển tốt và có hoạt tính  $\beta$ -galactosidase cao nhất là 478 U/L (Jaturapiree & cs., 2012). Các kết quả cho thấy đối với một số chủng *Bacillus*, điều kiện nhiệt độ và pH tối ưu của môi trường có thể khác nhau để sinh tổng hợp enzyme  $\beta$ -galactosidase một cách tối đa.

### 4. Kết luận

Nghiên cứu cho thấy trong tổng số 21 chủng *Bacillus* spp. được khảo sát, có 6 chủng có khả năng sinh enzyme  $\beta$ -galactosidase. Trong số đó, 4 chủng (B6, B9, B17 và B18) cho kết quả dương tính màu xanh đậm khi thử nghiệm với X-gal. Hoạt tính của enzyme  $\beta$ -galactosidase đã được xác định cho 4 chủng *Bacillus* spp. này và chủng B18 thể hiện hoạt tính enzyme cao nhất, được định danh là *B. licheniformis* B18. Nghiên cứu môi trường lên men sản xuất enzyme  $\beta$ -galactosidase từ chủng này cho thấy điều kiện thích hợp cho quá trình lên men là pH 7,0 và nhiệt độ ở 30°C.

**Lời cảm ơn:** Nhóm tác giả chân thành cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí của Trường Đại học Cần Thơ thông qua đề tài “Tuyển chọn các chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. có khả năng sinh enzyme beta-galactosidase” (mã số TSV2021-146).

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Akcan, N. (2018). Cultural conditions optimization for production of  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus licheniformis* ATCC 12759 under solid-state fermentation. *Turkish Journal of Biochemistry*, 43(3), 240-247. <https://doi.org/10.1515/tjb-2017-0153>
- Al-Jazairi, M., Abou-Ghorrah, S., & Bakri, Y. (2014). Isolation and identification of a new yeast isolate with high beta-galactosidase activity from Syrian dairy products. *International Food Research Journal*, 21(2), 541-546.



- Amin, A. A., & Ali, S. M. (2023). Characterization of an isolated lactase enzyme produced by *Bacillus licheniformis* ALSZ2 as a potential pharmaceutical supplement for lactose intolerance. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1180463. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1180463>.
- Bahaddad, S. A., Almalki, M. H., Alghamdi, O. A., Sohrab, S. S., Yasir, M., Azhar, E. I., & Chouayekh, H. (2023). *Bacillus* species as direct-fed microbial antibiotic alternatives for monogastric production. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *15*(1), 1-16. <https://doi.org/10.1007/s12602-022-09909-5>.
- Batra, N., Singh, J., Banerjee, U. C., Patnaik, P. R., & Sobti, R. C. (2002). Production and characterization of a thermostable  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus coagulans* RCS3. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *36*(1), 1-6. <https://doi.org/10.1042/ba20010091>.
- Dominici, S., Marescotti, F., Sanmartin, C., Macaluso, M., Taglieri, I., Venturi, F., Zinnai, A. & Facioni, M. S. (2022). Lactose: Characteristics, food and drug-related applications, and its possible substitutions in meeting the needs of people with lactose intolerance. *Foods*, *11*(10), 1486. <https://doi.org/10.3390/foods11101486>
- Elsayed, E. A., Danial, E. N., Wadaan, M. A., & El-Enshasy, H. A. (2019). Production of  $\beta$ -galactosidase in shake-flask and stirred tank bioreactor cultivations by a newly isolated *Bacillus licheniformis* strain. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *20*, 101231. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101231>.
- Ghani, M., Ansari, A., Aman, A., Zohra, R. R., Siddiqui, N. N., Qader, S. A. (2013). Isolation and characterization of different strains of *Bacillus licheniformis* for the production of commercially significant enzymes. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, *26*(4): 691-697.
- Husain, Q. (2010).  $\beta$ -galactosidases and their potential applications: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, *30*(1), 41-62. <https://doi.org/10.3109/07388550903330497>.
- Jaturapiree, P., Phuengjayaeam, S., Seangsawang, P., Srila, W., & Muangnapoh, C. (2012). Isolation and production of novel [ $\beta$ ]-galactosidase from a newly isolated, moderate thermophile, *Bacillus* sp. strain B1.1. *Journal of Food Science and Engineering*, *2*(7), 395-402. <https://doi.org/10.17265/2159-5828/2012.07.006>.
- Juajun, O., Nguyen, T. H., Maischberger, T., Iqbal, S., Haltrich, D., & Yamabhai, M. (2011). Cloning, purification, and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus licheniformis* DSM 13. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *89*, 645-654. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2862-2>.
- Kamran, A., Bibi, Z., Aman, A., & Qader, S. A. U. (2016). Lactose hydrolysis approach: isolation and production of  $\beta$ -galactosidase from newly isolated *Bacillus* strain B-2. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *5*, 99-103. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.12.010>.
- Kuribayashi, L. M., do Rio Ribeiro, V. P., De Santana, R. C., Ribeiro, E. J., Dos Santos, M. G., Falleiros, L. N. S. S., & Guidini, C. Z. (2021). Immobilization of  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus licheniformis* for application in the dairy industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *105*, 3601-3610. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11325-8>.
- Logan, N. A., Hoffmaster, A. R., Shadomy, S. V. & Stauffer, K. E. (2011). *Bacillus* and other aerobic endospore-forming bacteria. In J. Versalovic, K. C. Carroll, G. Funke, J. H. Jorgensen, M. L. Landry & D. W. Warnock (editors), *Manual of Clinical Microbiology*, 10<sup>th</sup> ed., vol. 1 (381-402). Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Lyngwi, N. A., and Joshi, S. R. (2014). Economically important *Bacillus* and related genera: A mini review. In A. Sen (editor) *Biology of Useful Plants and Microbes* (33-43). New Delhi: Narosa Publishing House.
- Mattar, R., de Campos Mazo, D. F., & Carrilho, F. J. (2012). Lactose intolerance: diagnosis,



- genetic, and clinical factors. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 113-121. <https://doi.org/10.3390/foods11101486>.
- Nguyễn, T. T., Trần, T. N., Nguyễn, T. L. Đ., Nguyễn, H. A. (2021).  $\beta$ -galactosidase của chủng *Lactobacillus fermentum* FV4: Từ tuyển chọn chủng đến xác định đặc tính tạo galactooligosaccharide của enzyme. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 19(6), 745-755.
- Nguyen, T. H., Splechtna, B., Steinböck, M., Kneifel, W., Lettner, H. P., Kulbe, K. D., & Haltrich, D. (2006). Purification and characterization of two novel  $\beta$ -galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(14), 4989-4998. 10.1021/jf053126u.
- Princely, S., Basha, N. S., Kirubakaran, J. J., & Dhanaraju, M. D. (2013). Biochemical characterization, partial purification, and production of an intracellular beta-galactosidase from *Streptococcus thermophilus* grown in whey. *European Journal of Experimental Biology*, 3(2), 242-251.
- Raveendran, S., Parameswaran, B., Ummalyama, S. B., Abraham, A., Mathew, A. K., Madhavan, A., & Pandey, A. (2018). Applications of microbial enzymes in food industry. *Food Technology and Biotechnology*, 56(1), 16-30. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.01.18.5491>.
- Rehamnia, B., Lee, N. M., Kuktaite, R., & Kacem Chaouche, N. (2022). Screening of spore-forming bacteria with probiotic potential in Pristine Algerian Caves. *Microbiology Spectrum*, 10(5), e00248-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00248-22>.
- Saqib, S., Akram, A., Halim, S. A., & Tassaduq, R. (2017). Sources of  $\beta$ -galactosidase and its applications in food industry. 3 *Biotech*, 7, 1-7. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0645-5>.
- Shelef, L.A. (2003). *Bacillus*: Detection. In Benjamin Caballero (Editor-in-Chief), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (2<sup>nd</sup> ed.), 358-365. Cambridge: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00075-4>.
- Sewalt, V., Shanahan, D., Gregg, L., La Marta, J., & Carrillo, R. (2016). The generally recognized as safe (GRAS) process for industrial microbial enzymes. *Industrial Biotechnology*, 12(5), 295-302. <https://doi.org/10.1089/ind.2016.0011>.
- Sonune, N. & Garode, A. (2018). isolation, characterization and identification of extracellular enzyme producer *Bacillus licheniformis* from municipal wastewater and evaluation of their biodegradability. *Biotechnology Research and Innovation*, 2(1), 37-44. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2018.03.001>.
- Su, Y., Liu, C., Fang, H., & Zhang, D. (2020). *Bacillus subtilis*: A universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. *Microbial Cell Factories*, 19, 1-12.
- Volford, B., Varga, M., Szekeres, A., Kotogán, A., Nagy, G., Vágvölgyi, C., & Takó, M. (2021).  $\beta$ -galactosidase-producing isolates in mucoromycota: Screening, enzyme production, and applications for functional oligosaccharide synthesis. *Journal of Fungi*, 7(3), 229. <https://doi.org/10.3390/jof7030229>.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697-703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>.