

# 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<sup>1,2,\*</sup>, Trịnh Thị Tuyết Hoa<sup>2</sup>, Võ Thị Ngọc Diệp<sup>2</sup>, Nguyễn Văn Thành<sup>2</sup>

## 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.

<sup>1</sup> Trường Cao đẳng Kinh tế - Kỹ thuật Cần Thơ

<sup>2</sup> 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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7	Soya peptone	10	Bột sữa gầy	28	Peptone	15
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2	Yeast extract	10	Tryptone	5	Tryptone	5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	Maltose	20	Yeast extract	2,5	Yeast extract	10
Glucose	1	Glucose	2	Dextrose (Glucose)	1	NaCl	5
Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	0,5	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2	Agar	15		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1	MgSO <sub>4</sub>	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. Trải 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 10<sup>6</sup> 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