

β -GALACTOSIDASE CỦA CHỦNG *Lactobacillus fermentum* FV4: TỪ TUYỂN CHỌN CHỦNG ĐẾN XÁC ĐỊNH ĐẶC TÍNH TẠO GALACTO-OLIGOSACCHARIDE CỦA ENZYME

Nguyễn Tiến Thành², Trần Thị Na³, Nguyễn Thị Lâm Đoàn¹, Nguyễn Hoàng Anh^{1*}

¹*Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

²*Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Đại học Bách Khoa Hà Nội*

³*Công ty TNHH Yakult Việt Nam*

*Tác giả liên hệ: hoanganhcntp@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 01.03.2021

Ngày chấp nhận đăng: 04.05.2021

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm tuyển chọn, định danh chủng vi khuẩn lactic sinh enzyme β -galactosidase có hoạt tính transgalactosyl và xác định đặc tính của enzyme để định hướng ứng dụng trong sản xuất Galacto-oligosacchride (GOS). β -galactosidase của chủng vi khuẩn FV4 phân lập từ dưa cải lên men được xác định có hoạt tính transgalactosyl, chuyển hóa lactose thành GOS thông qua phân tích sản phẩm chuyển hóa bằng sắc ký bản mỏng (TLC). Chủng FV4 được xác định và đặt tên là *Lactobacillus fermentum* FV4 dựa trên việc so sánh trình tự đoạn gen mã hoá 16S rRNA. Kết quả xác định đặc tính của β -galactosidase kỹ thuật của chủng này chỉ ra rằng enzyme có hoạt độ cao nhất trong dải pH từ 6,5-8,5 và bền nhất tại pH 7,5, sau 24 giờ tại pH 7,5 hoạt tính của enzyme vẫn còn 92,8%. Enzyme có hoạt độ tối ưu ở 50°C và bền tại nhiệt độ 30°C trong 24 giờ. Thêm vào đó, K⁺, Na⁺, DTT với nồng độ 1 và 10mM, cũng như Mg²⁺ với nồng độ 1mM làm tăng hoạt tính xúc tác của enzyme. Sản phẩm chuyển hóa lactose thành GOS của enzyme β -galactosidase đã được phân tích bằng TLC và HPLC cho thấy enzyme β -galactosidase chuyển hóa được 65% lactose thành 8% GOS trong thời gian 6 giờ phân giải.

Từ khóa: β -galactosidase, transgalactosyl, galacto-oligosaccharides.

β -galactosidase from *Lactobacillus fermentum* FV4: from Strain Identification to Characterization of Galacto-oligosaccharide Production of Enzyme

ABSTRACT

This study was conducted to select, identify lactic acid bacteria strain producing enzyme β -galactosidase with trans-galactosylation activity and determine the characteristics of enzyme applied in Galacto-oligosacchride (GOS) production. β -galactosidase of lactic bacterial strain FV4 isolated from the fermented mustard has been recorded as trans-galactosylation enzyme which converts lactose to GOS via the conversion product by using thin-layer chromatography (TLC). FV4 strain was identified and named *Lactobacillus fermentum* FV4 based on the comparison of sequence encoding for 16rRNA gene. Characterization of technical β -galactosidase from this strain indicated that enzyme activity was the highest in the pH ranged from 6.5 to 8.5 and the most stable was at pH 7.5, after 24h of incubation in pH 7.5, the enzyme activity has still remained 92.8%. The optimal temperature of enzyme was 50°C and enzyme was very stable at 30°C in 24h of incubation. In addition, K⁺, Na⁺, DTT 1mM, 10mM, and Mg²⁺ 1mM activated the enzyme activity. Products of lactose conversion by using enzyme β -galactosidase were analyzed based on TLC and HPLC showed that 65% lactose was converted to 8% GOS within 6h.

Keywords: β -galactosidase, transgalactosylation, galacto-oligosaccharides.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

β -galactosidase hay còn gọi là Lactase (E.C. 3.2.1.23) là một loại enzyme đã và đang được

ứng dụng nhiều trong ngành công nghiệp chế biến sữa (Nakayama & Amachi, 1999). β -galactosidase có khả năng xúc tác cho hai kiểu phản ứng: thủy phân lactose thành glucose

β -galactosidase của chủng *Lactobacillus fermentum* FV4: từ tuyển chọn chủng đến xác định đặc tính tạo Galacto-oligosaccharide của enzyme

và galactose và phản ứng transgalactosyl hóa để biến đổi lactose thành galacto-oligosaccharide (GOS). Hiện nay, giá trị dinh dưỡng của lactose bị hạn chế vì khoảng 70% người trưởng thành trên thế giới thiếu enzyme β -galactosidase trong hệ tiêu hóa, do đó gây ra triệu chứng khó tiêu hoặc không dung nạp lactose (Corgneau & cs., 2015). Tuy nhiên, điều này tạo ra một thị trường tiềm năng cho việc nghiên cứu sản xuất, ứng dụng β -galactosidase trong công nghiệp chế biến sữa. Ngoài ra, khả năng thủy phân lactose của enzyme này còn mang lại nhiều lợi ích khác trong công nghiệp thực phẩm như làm tăng độ ngọt, giảm hiện tượng kết tinh của lactose trong các sản phẩm sữa. Hơn nữa, việc áp dụng β -galactosidase rất quan trọng trong việc chuyển đổi lactose trong whey, sản xuất sữa có hàm lượng lactose thấp trong ngành công nghiệp sữa để đáp ứng nhu cầu của phần lớn dân số không dung nạp lactose, nhạy cảm với lactose do thiếu lactase trong đường ruột (Corgneau & cs., 2015). Quá trình thủy phân lactose sẽ tạo ra GOS nhờ khả năng chuyển hóa gốc galactosyl. Sản phẩm này đã được chứng minh là prebiotics, giúp cải thiện hệ vi sinh vật đường ruột, sức đề kháng cho con người và đã được bổ sung vào thực phẩm, đặc biệt là các sản phẩm chế biến từ sữa (Torres & cs., 2010). Hiện nay, việc kết hợp prebiotic GOS với probiotics trong các nguồn thực phẩm đã được chứng minh mang lại lợi ích mạnh mẽ cho sức khỏe tổng thể của con người (Sanders & cs., 2019). Ngày nay, việc sử dụng hóa chất trong ngành thực phẩm không được khuyến khích, vì vậy, việc nghiên cứu β -galactosidase sinh ra từ vi khuẩn an toàn trong thực phẩm (GRAS) có hoạt tính transgalactosyl để sản xuất GOS là xu hướng tất yếu. Hầu hết các nghiên cứu tập trung vào vi khuẩn sinh axit lactic (LAB), đặc biệt là *Lactobacillus* và *Bacillus*. sp. Một số chủng trong số chúng có thể được liệt kê như *L. plantarum*, *B. polymyxa*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*... (Miller & cs., 1995), *L. acidophilus* (Nguyen & cs., 2007), *L. reuteri* (Nguyen & cs., 2006). Hầu hết các phân tử enzyme có nguồn gốc từ nhóm vi khuẩn lactic là dị hợp tử bao gồm hai tiểu phần khác nhau là LacL (tiểu phần lớn) và LacM (tiểu phần nhỏ); trừ enzyme từ *L. bulgaricus* có cấu tạo đồng

phân tử bao gồm hai tiểu phần giống nhau LacZ. Khối lượng phân tử của β -galactosidase từ *L. delbruekii subsp. bulgaricus*, *L. delbruekii subsp. lactis* và *L. casei subsp. Casei* được phân lập từ sữa và phomat có 2 đơn phân với kích thước ~ 116 kDa và ~ 35 kDa trong khi với β -galactosidase từ *L. reuteri* có kích thước đơn phân lớn là ~ 72 kDa, β -galactosidase từ *L. helveticus* có kích thước ~ 65 kDa (Nguyen & cs., 2006). Enzyme từ *Lactobacillus* thường có giá trị pH tối ưu trong khoảng trung tính 6-7. Nhiệt độ tối ưu trong khoảng 50-60°C, tuy nhiên hầu hết không bền trong khoảng nhiệt độ này (Nguyen & cs., 2006).

Trong nghiên cứu này, 10 chủng vi khuẩn lactic được phân lập từ dưa cải muối lên men truyền thống ở Việt Nam được sử dụng để tuyển chọn chủng có khả năng sinh enzyme β -galactosidase có đặc tính transgalactosyl, định hướng ứng dụng enzyme sản xuất GOS từ lactose.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Mười chủng vi khuẩn *Lactic* spp. phân lập từ dưa cải muối ký hiệu là FV (fermented vegetable) đã được định danh sơ bộ bằng phương pháp hình thái, sinh hoá, và có khả năng sinh enzyme β -galactosidase được sử dụng để tuyển chọn chủng sinh enzyme β -galactosidase có hoạt tính transgalactosyl.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xác định hoạt độ của enzyme

Hoạt độ của β -galactosidase được xác định bằng cách sử dụng *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (*o*NPG) làm cơ chất như mô tả bởi Nguyen & cs. (2006), tóm tắt như sau: Phản ứng enzyme - cơ chất được bắt đầu bằng cách thêm 20 μ l mẫu enzyme vào 480 μ l 22mM *o*NPG pha trong đệm 50mM phosphate pH 6,5, sau đó được ủ trong 10 phút ở 30°C, tốc độ lắc 600 vòng/phút. Phản ứng được dừng bằng cách cho thêm 750 μ l 0,4M Na₂CO₃, *o*-nitrophenol (*o*NP) tạo ra được xác định bằng cách đo độ hấp

thu ở 420nm. Một đơn vị hoạt độ của β -galactosidase được định nghĩa là lượng enzyme giải phóng 1 μ mol oNP/1 phút trong các điều kiện phản ứng nêu trên.

2.2.2. Lựa chọn chủng dựa trên đặc tính transgalactosyl

Các chủng vi khuẩn Lactic được nuôi cấy trong môi trường lỏng MRS (pH 6,5) chứa 1% (w/v) lactose ở 37°C, lắc 200 vòng/phút. Sau 24 giờ nuôi cấy, dịch nuôi cấy được ly tâm ở 4°C, 4.000 vòng/phút để thu sinh khối. Lượng sinh khối 0,1g được hòa tan trong 0,5ml đệm phosphate, pH 6,5 và được phá vỡ bằng siêu âm (trong 5 phút với thời gian siêu âm/ngiht là 30s/30s) với hệ thống Vibra Cell VCX 130. Dịch thu được đem ly tâm 10.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C để loại xác tế bào và thu dịch enzyme thô. Hỗn hợp enzyme nội bào (0,6U oNPG) và đường lactose 600mM với tỷ lệ 1:1 được ủ ở 30°C, lắc 600 vòng phút trên máy ổn nhiệt khô (Eppendorf) trong 24h. Sản phẩm thủy phân (2 μ l) được đưa lên bản sắc ký bản mỏng TLC như mô tả của Nguyen & cs. (2006), với dung môi phân tách oligosaccharide là hỗn hợp Butanol: propanol: etanol: dH₂O là 2: 3: 3: 2. Bản TLC sau khi chạy được sấy khô, phun dung dịch nhuộm chứa 0,5g thymol: 95ml etanol: 5ml H₂SO₄, hiện màu bằng cách sấy ở 130°C. Sự xuất hiện các vạch sắc ký ứng với galactooligosaccharide sẽ là dấu hiệu cho thấy enzyme của chủng đang quan tâm có đặc tính transgalactosyl.

2.2.3. Định danh chủng được tuyển chọn bằng phương pháp xác định trình tự gen mã hóa vùng 16S rRNA

Vùng mã hoá cho 16S rRNA của chủng vi khuẩn sinh β -galactosidase có đặc tính transgalactosyl được nhân lên bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Chen & cs., 2008) và được giải trình tự gen bởi tại hãng First-base, Malaysia. Trình tự này được so sánh mức độ tương đồng di truyền với các loài trên ngân hàng gen NCBI bằng công cụ BLAST.

2.2.4. Xác định đặc tính của β -galactosidase kỹ thuật từ chủng đã lựa chọn

Enzyme thô chuẩn bị như ở phần 2.2. được sử dụng để tinh sạch sơ bộ bằng phương pháp kết tủa sulfat amon phân đoạn 20-70% bão hoà. Thành phần muối trong kết tủa được loại bỏ bằng màng cut-off 10kDa Amicon (Milipore). Dịch enzyme kỹ thuật sau đó được sử dụng để xác định các đặc tính của nó.

Xác định pH tối ưu và độ bền pH của enzyme β -galactosidase: pH tối ưu được xác định theo phương pháp xác định hoạt độ của enzyme (mục 2.1) với cơ chất được pha trong đệm Britton Robinson với giá trị pH từ 4 đến 9. Để xác định độ bền pH, enzyme được ủ trong các dung dịch đệm có pH từ 5,5-7,5 ở 30°C. Ở các thời gian khác nhau, mẫu enzyme được lấy để xác định hoạt độ còn lại theo mục 2.1.

Xác định nhiệt độ tối ưu và độ bền nhiệt của enzyme β -galactosidase: Nhiệt độ tối ưu là nhiệt độ tại đó hoạt độ enzyme là cao nhất và được xác định bằng hoạt độ enzyme theo mục 2.1 tại các nhiệt độ 20-90°C.

Tương tự, để xác định độ bền nhiệt, enzyme được ủ ở các nhiệt độ 30, 40, và 50°C. Tại các thời gian ủ khác nhau, enzyme lấy ra để xác định hoạt độ còn lại (theo phương pháp mô tả ở mục 2.2.1). Độ bền nhiệt của enzyme được xác định bằng cách so sánh % hoạt độ còn lại của enzyme tại thời điểm đo với thời điểm bắt đầu ủ.

Ảnh hưởng của các ion kim loại và DTT đến hoạt độ của β -galactosidase:

Ảnh hưởng của các ion kim loại (K⁺, Na⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺) và DTT được xác định theo Nguyen & cs. (2012). Enzyme được ủ ở 30°C trong vòng 10 phút với 20mM oNPG (10mM Bis-Tris, pH 6,5) như là cơ chất với sự bổ sung các ion kim loại/DTT để được các nồng độ cuối cùng của ion kim loại/DTT khác nhau (1-10mM). Hoạt độ của enzyme không có các ion kim loại được thêm vào được coi là hoạt động 100% để so sánh với hoạt độ của enzyme của các mẫu có bổ sung ion kim loại/DTT.

Xác định khả năng chuyển hóa lactose thành galacto-oligosaccharide của β -galactosidase:

β -galactosidase của chủng *Lactobacillus fermentum* FV4: từ tuyển chọn chủng đến xác định đặc tính tạo Galacto-oligosaccharide của enzyme

Hỗn hợp phản ứng lactose (600mM): enzyme (6 U_{oNPG}) = 3:7 được ủ ở nhiệt độ 30°C và 600 vòng/ phút. Tại từng thời gian của quá trình thủy phân (0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 giờ), 20 μ l mẫu được thu, xử lý nhiệt ở 99°C trong 5 phút để bất hoạt enzyme, và được sử dụng để phân tích bằng TLC (như mục 2.2.2) và sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột phân tích HPX87C (Aminex Biorad, US) như mô tả bởi Nguyen & cs. (2012). Lượng GOS được tính toán dựa trên lượng lactose ban đầu trừ đi lactose còn lại và lượng glucose, galactose tạo thành.

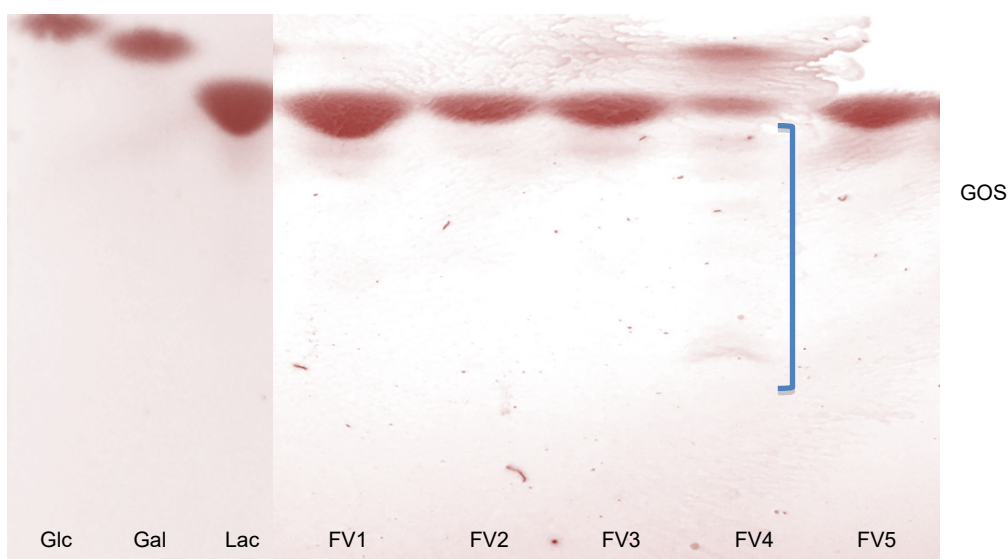
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định hoạt độ enzyme thô β -galactosidase của 10 chủng vi khuẩn lactic

Mười chủng vi khuẩn lactic phân lập từ rau lên men đã được xác định có hoạt tính enzyme β -galactosidase được nuôi cấy trong cùng điều kiện môi trường MRS với 1% lactose ở 30°C trong 24 giờ. Sinh khối tế bào từ quá trình lên men của 10 chủng phân lập được phá vỡ bằng siêu âm để giải phóng β -galactosidase nội bào. Hoạt độ của enzym nội bào được xác định như mục 2.2.1 và được thể hiện như ở bảng 1.

Bảng 1. Hoạt độ của β -galactosidase nội bào từ 10 chủng vi khuẩn lactic

Tên chủng	U/l	% so với chủng cao nhất
FV1	360	78,3
FV2	230	50
FV3	280	60
FV4	460	100
FV5	330	71,8
FV6	40	8,7
FV7	120	26,1
FV8	110	23,9
FV9	150	32,6
FV10	80	17,4



Ghi chú: Glc = glucose, Gal = galactose, Lac = lactose.

Hình 1. Kết quả phân tích định tính các sản phẩm chuyển hóa lactose của enzyme β -galactosidase bằng TLC

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, chủng FV4 có hoạt độ enzyme cao nhất đạt 460 U/l. Để so sánh hoạt độ giữa các chủng với nhau, chủng có hoạt độ cao nhất (FV4) được coi là 100%. Kết quả so sánh theo % hoạt độ chỉ ra rằng, chủng FV4 cao hơn rất nhiều so với 05 chủng FV6, FV7, FV8, FV9, FV10, hoạt độ của các chủng này chỉ đạt từ 8,7% đến 32,6% so với chủng FV4. Cụ thể, chủng FV6 đạt 8,7%, chủng FV7 đạt 26,1%, chủng FV8 đạt 23,9%, chủng FV9 đạt 32,6% và chủng FV10 đạt 17,4% so với chủng FV4.

Các chủng FV1, FV2, FV3, FV4 và FV5 có hoạt độ enzyme cao nhất được sử dụng để tuyển chọn chủng tạo beta-galactosidase có hoạt tính transgalactosyl.

3.2. Tuyển chọn chủng tạo enzyme β -galactosidase có đặc tính transgalactosyl

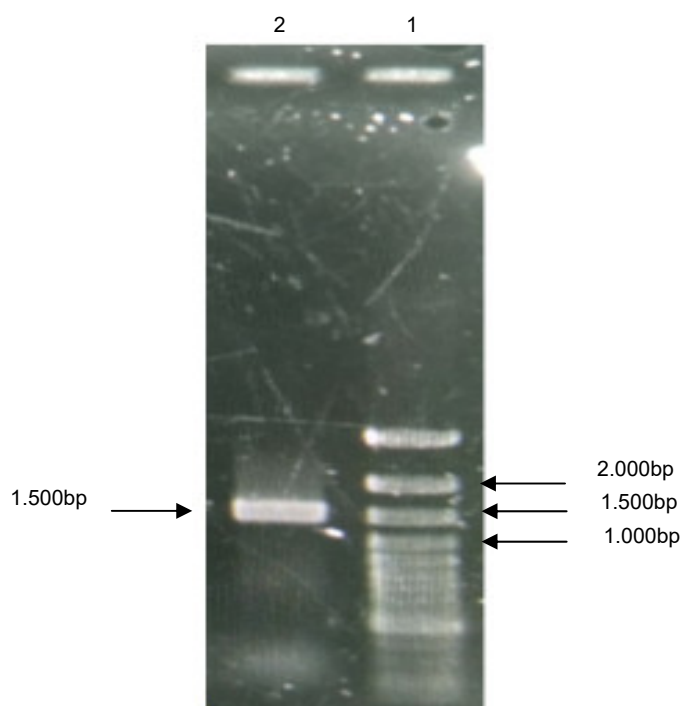
Phương pháp thực hiện ở mục 2.2.2 được áp dụng cho các chủng FV1, FV2, FV3, FV4 và FV5 cho kết quả thể hiện trên hình 1. Kết quả TLC cho thấy chỉ có enzyme từ chủng FV4 làm giảm độ đậm của vạch ứng với lactose nhất (sau 24h), điều này có nghĩa có sự phân giải lactose. Kèm

với đó là xuất hiện các vạch ứng với các galacto-oligosaccharide. Trong khi đó, sản phẩm chuyển hóa lactose của enzyme β -galactosidase từ 4 chủng gồm FV1, FV2, FV3, FV5 chỉ chứa 1-2 dải galacto - oligosaccharide nhưng sản phẩm mờ, vạch ứng với lactose còn khá đậm (Hình 1). Enzyme β -galactosidase từ chủng FV4 có hoạt tính transgalactosyl chuyển hóa lactose thành hỗn hợp GOS cao nhất cũng như nhiều loại oligosaccharide nhất được chọn lựa cho việc định danh cũng như xác định đặc điểm của enzyme beta-galactosidase thu nhận từ chủng này.

3.3. Định danh chủng vi khuẩn FV4 bằng phương pháp xác định trình tự gen mã hóa vùng 16S rRNA

3.3.1. Kết quả khuếch đại sản phẩm PCR

Để định danh chính xác chủng vi khuẩn lactic FV4, phản ứng PCR được thực hiện với cặp mồi 27F và 1492R để nhân vùng gen mã hóa tiểu phần 16S RNA ribosome. Kết quả thu được là 1 băng sản phẩm PCR duy nhất có kích thước ~1.500bp theo dự kiến (Hình 2).



Giếng số 1: Thang DNA chuẩn 100bp DNA ladder, New England Biolabs, Giếng số 2: sản phẩm PCR.

Hình 2. Sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen mã hóa vùng 16SrRNA của chủng FV4

β -galactosidase của chủng *Lactobacillus fermentum* FV4: từ tuyển chọn chủng đến xác định đặc tính tạo Galacto-oligosaccharide của enzyme

```

CTATACATGCAAGTCGAACGCGTTGGCCCAATTGATTGATGGTGCTTGCACCTGATTGAT
TTTGGTCGCCAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCAGAAGCG
GGGACAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAGCGTTGTTTCGCATGAACAAC
GCTTAAAAGATGGCTTCTCGCTATCACTTCTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTTGTTG
GTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCA
CAATGGGACTGAGACACGGCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCAC
AATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAA
AGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACACGTATGAGAGTAACTGTTACATACGTTGACGGTATTTAA
CCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT
TATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGAGTGCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGC
CTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAACTGGATAACTTGAGTGCAGAAGAGGGTA
GTGGAACCTCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAA
GGCGGCTACCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGAT
TAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGC
CCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTT
GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCGCCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGA
AGCTACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCTTGCGCCAACCTAGAGATAGGGCG
TTTCCTTCGGGAACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTA
TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGG
GCACTCTAGTGAGACTGCCGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGATCATC
ATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAA
CTCGCGAGGGCAAGCAAATCTTAAAACCGTTCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTC
GCCTGCACGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCC
CCGGGCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGTCGGTGG
GGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCTAAG
    
```

Hình 3. Trình tự vùng gen mã hóa 16S rRNA của FV4

Query ID: lcl|Query_306539
 Description: None
 Molecule type: dna
 Query Length: 1455
 Other reports: [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Sequences producing significant alignments

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/> Lactobacillus fermentum strain 2998 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Limosilactobacillus fermentum	2682	2682	100%	0.0	99.93%	1481	MT611930.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus fermentum strain 2951 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Limosilactobacillus fermentum	2682	2682	100%	0.0	99.93%	1478	MT611890.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus fermentum strain 5592 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Limosilactobacillus fermentum	2682	2682	100%	0.0	99.93%	1486	MT510335.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus fermentum strain 4820 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Limosilactobacillus fermentum	2682	2682	100%	0.0	99.93%	1479	MT505590.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus fermentum strain 8041 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Limosilactobacillus fermentum	2682	2682	100%	0.0	99.93%	1460	MT464225.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus fermentum strain 7932 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Limosilactobacillus fermentum	2682	2682	100%	0.0	99.93%	1461	MT464205.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus fermentum strain 6361 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Limosilactobacillus fermentum	2682	2682	100%	0.0	99.93%	1476	MT463770.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus fermentum strain 6351 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Limosilactobacillus fermentum	2682	2682	100%	0.0	99.93%	1480	MT463760.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus fermentum strain 6325 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Limosilactobacillus fermentum	2682	2682	100%	0.0	99.93%	1477	MT463670.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus fermentum strain 6043 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Limosilactobacillus fermentum	2682	2682	100%	0.0	99.93%	1498	MT463623.1
<input type="checkbox"/> Lactobacillus fermentum strain 5098 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Limosilactobacillus fermentum	2682	2682	100%	0.0	99.93%	1486	MT463402.1

Hình 4. Kết quả Blast so sánh trình tự nucleotide 16S rRNA của chủng FV4 với trình tự nucleotide 16S rRNA của các chủng vi khuẩn trên Genbank

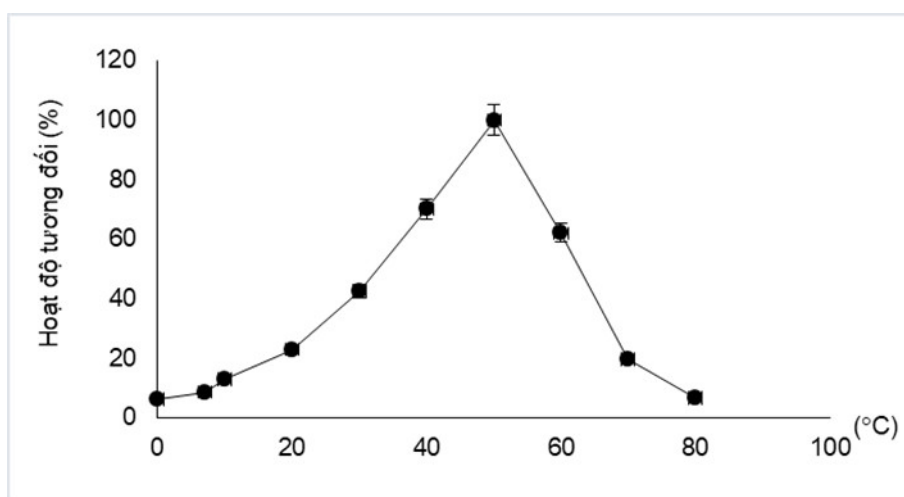
3.3.2. Kết quả giải trình tự nucleotide 16S rRNA

Trình tự nucleotide thu được từ vùng gen mã hóa 16S rRNA có kích thước 1.500bp, tín hiệu rõ không nhòe, không bị trùng các đỉnh tín hiệu. Sau khi tiến hành xử lý các tín hiệu nhiễu, trình tự nucleotide 16S rRNA của chủng FV4 được so sánh với trình tự nucleotide 16S rRNA của các chủng vi khuẩn trên Genbank sử dụng công cụ BLAST. Kết quả so sánh cho thấy vi khuẩn FV4 có độ tương đồng 100% với gen tương ứng từ loài *Lactobacillus fermentum* và do vậy được đặt tên là *Lactobacillus fermentum* FV4.

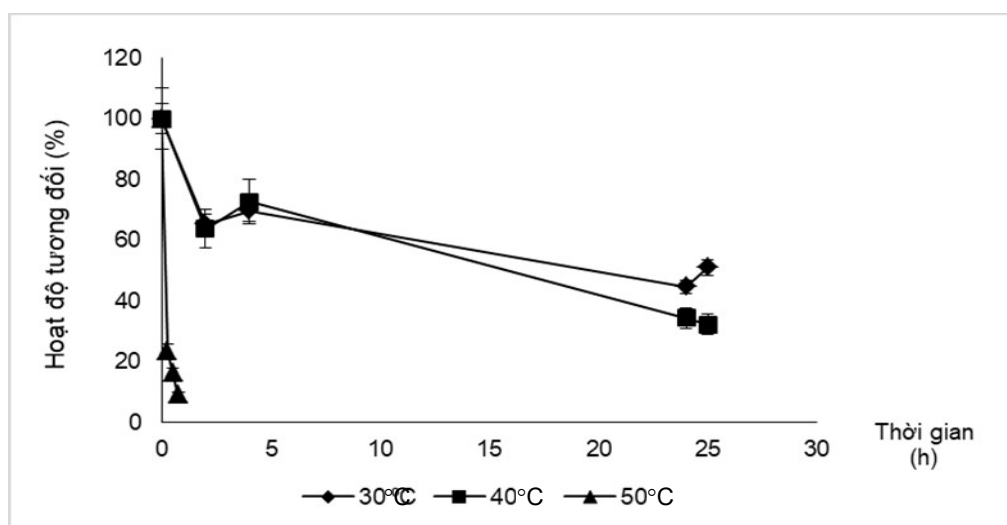
3.4. Xác định đặc tính của enzyme kỹ thuật

3.4.1. Ảnh hưởng của pH đến hoạt độ và độ bền của β -galactosidase từ *L. fermentum* FV4

Enzyme β -galactosidase thu nhận từ chủng *L. fermentum* FV4 hoạt động tối ưu ở pH 6,5; hoạt độ tương đối đạt 80% so với hoạt độ cực đại biểu hiện trong khoảng pH 6-8. Enzyme này hoạt động yếu ở pH có tính axit tuy nhiên vẫn có khoảng 30% hoạt độ tương đối ở pH 5 và 15% ở pH 4 (Hình 5). Enzyme có khoảng pH hoạt độ tối ưu ở môi trường trung tính tương tự như nhiều chủng trong chi *Lactobacillus* như: *L. fermentum* K4, *L. plantarum* WCFS1, *L. bulgaricus* DSM20081 (Liu & cs., 2011).

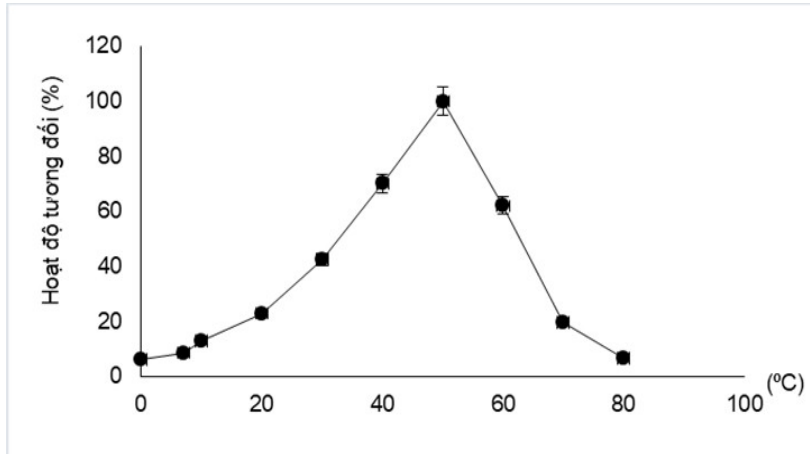


Hình 5. pH tối ưu của β -galactosidase từ *L. fermentum* FV4

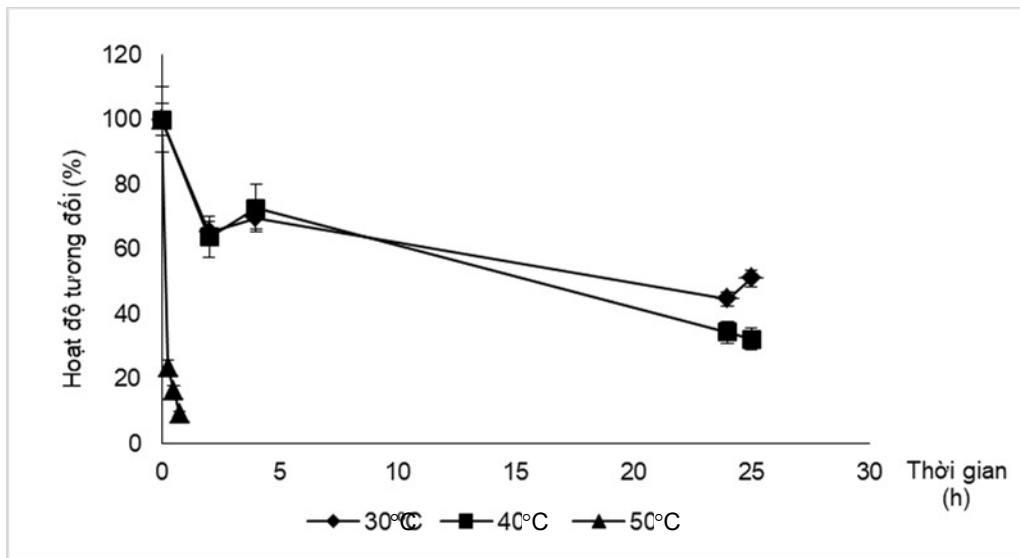


Hình 6. Độ bền pH của enzyme β -galactosidase từ *L. fermentum* FV4

β -galactosidase của chủng *Lactobacillus fermentum* FV4: từ tuyển chọn chủng đến xác định đặc tính tạo Galacto-oligosaccharide của enzyme



Hình 7. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt độ của β -galactosidase từ *L. fermentum* FV4



Hình 8. Độ bền nhiệt của β -galactosidase từ *L. fermentum* FV4

Trong nghiên cứu này, độ bền pH được xác định ở giá trị pH 6,5 và 7,5. Kết quả ở hình 4 chỉ ra rằng, enzyme rất kém bền ở pH có tính axit, ở pH 5,5 hoạt độ của enzyme giảm nhanh chóng chỉ còn khoảng 10% so với hoạt độ ban đầu sau 15 phút. Trong khi đó, enzyme lại rất bền ở pH trung tính, hầu như duy trì được hoạt độ sau 24 giờ ở pH 7,5. Đối với pH 6,5 enzyme duy trì được 50% hoạt độ sau 24 giờ ở mặc dù pH 6,5 là pH hoạt động tối ưu của enzyme. So sánh với chủng tái tổ hợp *L. fermentum* K4 cho thấy enzyme từ chủng này cũng có tính bền pH tương tự chủng FV4 (Liu & cs., 2011). Do đó để bảo quản tốt enzyme, khuyến nghị bảo quản ở pH 7,5 trong điều kiện nhiệt độ thấp.

3.4.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt độ và độ bền của β -galactosidase từ *L. fermentum* FV4

Nhiệt độ có tác động mạnh mẽ tới hoạt độ và độ bền của enzyme. Kết quả ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt độ của enzyme được thể hiện ở hình 7. Kết quả thí nghiệm cho thấy nhiệt độ tối ưu của β -galactosidase từ *L. fermentum* FV4 là 50°C.

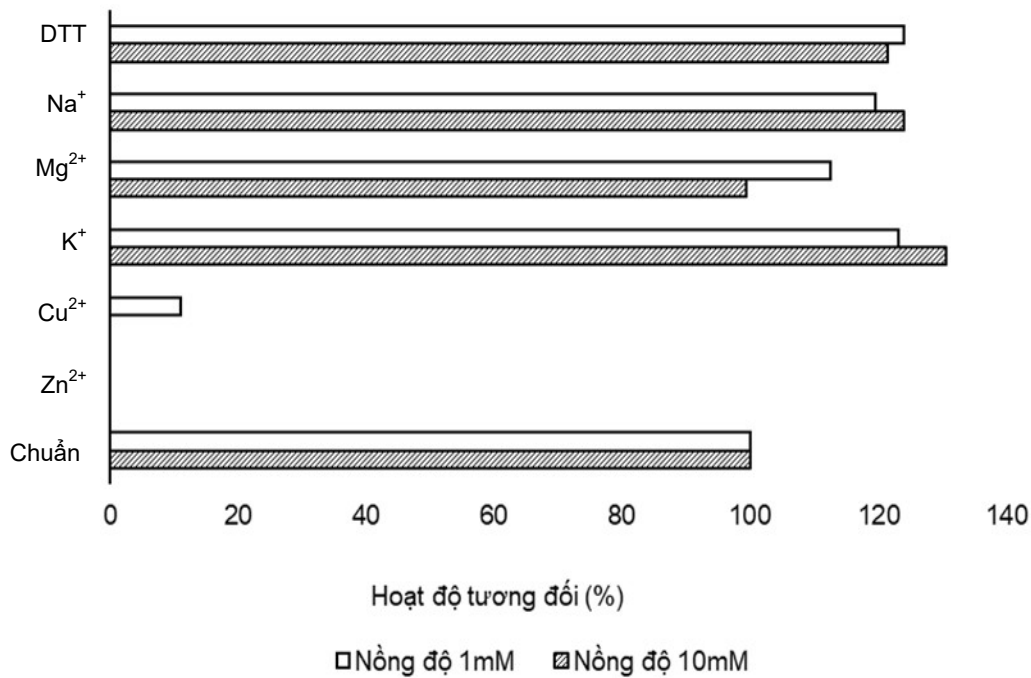
Kết quả đánh giá độ bền nhiệt của enzyme từ β -galactosidase từ *L. fermentum* FV4 ở nhiệt độ 30°C, 40°C, 50°C được thể hiện ở hình 8.

Mặc dù enzyme có nhiệt độ tối ưu là 50°C, tuy nhiên enzyme rất kém bền nhiệt ở nhiệt độ

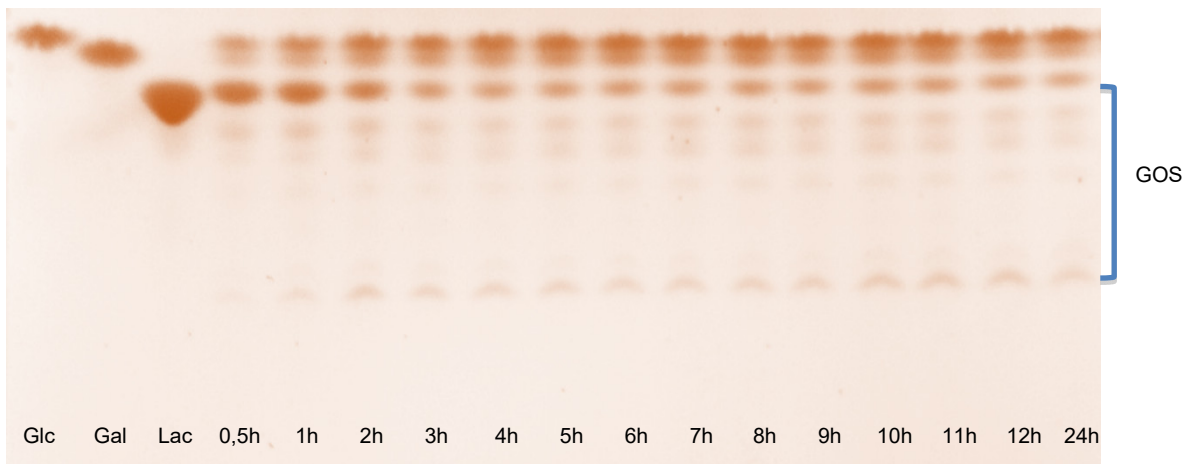
này, giảm nhanh xuống còn khoảng 10% hoạt độ chỉ sau 45 phút. Đối với điều kiện ủ nhiệt ở 40°C và 30°C, hoạt độ của enzyme giảm nhanh xuống 65% sau 1,5 giờ, sau đó giảm chậm trong thời gian 23 giờ tiếp theo. Sau 24 giờ, hoạt độ của enzyme còn khoảng 38% ở nhiệt độ 40°C và 50% ở nhiệt độ 30°C, tương tự như enzyme từ chủng *L. fermentum* K4 (Liu & cs., 2011). Như vậy, enzyme từ *L. fermentum* FV4 có thể đánh giá là kém hoạt động ở nhiệt độ cao trong thời gian dài.

3.4.3. Ảnh hưởng của các ion kim loại và DTT đến hoạt độ của β -galactosidase thô

Các ion kim loại và DTT đã được sử dụng để bổ sung vào cùng với cơ chất oNPG để đánh giá tác động của chúng tới hoạt độ của enzyme, từ đó có thể lựa chọn được ion kim loại có khả năng kích thích hoạt động xúc tác của β -galactosidase. Nồng độ ion kim loại và DTT được sử dụng là 1 và 10 mM như được mô tả ở phần 2.5.

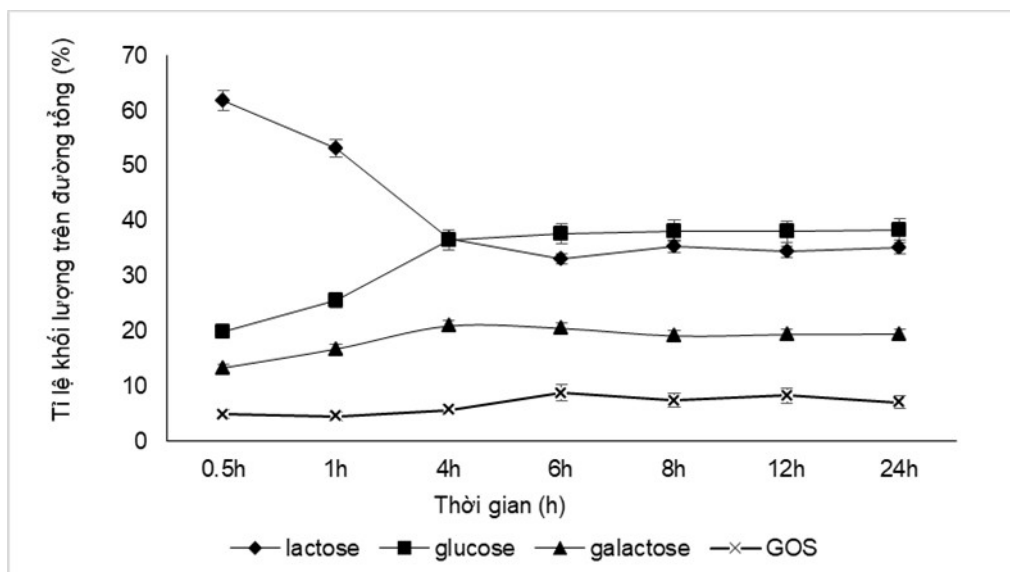


Hình 9. Ảnh hưởng của ion kim loại/DTT (nồng độ 1mM và 10mM) đến hoạt độ của β -galactosidase



Hình 10. Chuyển đổi lactose thành GOS của β -galactosidase từ *L. fermentum* FV4 trong điều kiện pH 6,5

β -galactosidase của chủng *Lactobacillus fermentum* FV4: từ tuyển chọn chủng đến xác định đặc tính tạo Galacto-oligosaccharide của enzyme



Hình 11. Khảo sát chuyển hóa lactose tạo GOS của enzyme β -gal từ chủng *L. fermentum* FV4 bằng phương pháp HPLC

Kết quả cho thấy, ảnh hưởng của ion kim loại ở các nồng độ khác nhau là khác nhau, hầu như nồng độ tăng thì mức độ ảnh hưởng tăng, tuy nhiên nhận định này chỉ mang tính tương đối cho phần lớn các chất. Bên cạnh đó khi có mặt ion Zn^{2+} và Cu^{2+} , enzyme mất hoạt độ hoàn toàn. Trong khi đó các ion K^+ , Na^+ , DTT hầu như làm tăng hoạt độ của enzyme. Ion K^+ ở nồng độ 10mM có thể tăng hoạt độ của enzyme đến 130%. Đối với ion Mg^{2+} , ở nồng độ 1mM làm tăng hoạt độ của enzyme đến 112% nhưng hầu như không có ảnh hưởng ở nồng độ cao hơn là 10mM. So sánh với kết quả nghiên cứu trên enzyme từ chủng *L. fermentum* K4 và *L. plantarum* WCSF1 nhận thấy rằng, mức độ ảnh hưởng của các ion kim loại lên các enzyme có nguồn gốc khác nhau là khác nhau, tuy nhiên ảnh hưởng ức chế hay hoạt hóa của các ion đối với các nguồn enzyme khác nhau lại hầu như tương đương, ví dụ ion Zn^{2+} và Cu^{2+} có ảnh hưởng như chất ức chế đối với hoạt động của enzyme β -galactosidase (Liu & cs., 2011; Iqbal & cs., 2010).

3.4.4. Xác định khả năng chuyển hóa lactose thành galacto-oligosaccharide của β -galactosidase

Với điều kiện phân giải lactose bằng enzyme thô, dịch thủy phân được phân tích

bằng TLC và HPLC (Hình 10 và Hình 11). Từ kết quả TLC (Hình 10), có thể thấy có sự giảm độ đậm của vạch lactose theo thời gian và sự tăng dần của các vạch ứng với glucose và galactose cũng như GOS. Ngay sau 0,5h cũng cho thấy sự tạo thành GOS. Điều này minh chứng khả năng chuyển gốc galactosyl của β -galactosidase từ FV4. Tương tự sự giảm lactose hay sự tăng lên của đường đơn và GOS được minh chứng ở kết quả phân tích HPLC (Hình 11). Tuy nhiên, có thể do điều kiện thủy phân chưa đảm bảo độ bền của enzyme (pH chưa phù hợp với độ bền), hoạt độ enzyme chưa đủ lớn nên chỉ sau 6h phân giải, giá trị của các thành phần trong hỗn hợp gần như không có sự thay đổi. Lactose chuyển hoá được khoảng 65%, ứng với sự giảm này, glucose và galactose đạt mức khoảng 38% và 20% tương ứng. Lượng GOS tạo ra được tính toán ở mức khoảng 8% (ứng với khoảng 11% lượng lactose chuyển hoá, đây cũng là tỷ lệ được công bố một số tác giả thế giới).

Mặc dù, hiệu quả phân giải lactose trong thử nghiệm này còn cần được khảo sát và tối ưu tiếp, nhưng sự tạo thành GOS với nhiều vạch kích thước khác nhau (Hình 10) cũng cho thấy tiềm năng lớn của của enzyme β -galactosidase từ FV4 để ứng dụng tạo probiotic.

4. KẾT LUẬN

Chủng vi khuẩn lactic FV4 có đặc tính transgalactosyl, chuyển hóa lactose thành GOS được định danh và đặt tên là *Lactobacillus fermentum* FV4. Kết quả phân tích sự chuyển hóa lactose thành GOS của enzyme β -galactosidase sử dụng phương pháp TLC và HPLC đã chỉ ra rằng enzyme β -galactosidase của chủng *Lactobacillus fermentum* FV4 chuyển hóa được 65% lactose thành 8% GOS trong thời gian 6 giờ phân giải.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn Dự án Việt Bỉ, Học viện Nông nghiệp Việt Nam đã tài trợ kinh phí để thực hiện đề tài “beta-galactosidase of food grade bacteria: from screening to production and preliminary application”. Kết quả nghiên cứu trong bài báo là một phần của đề tài Việt Bỉ này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chen W., Chen H., Xia Y., Zhao J., Tian F. & Zhang H. (2008). Production, purification, and characterization of a potential thermostable galactosidase for milk lactose hydrolysis from *Bacillus stearothermophilus*. *J Dairy Sci.* 91(5): 1751-58.
- Corgneau M., Scher J., Ritie-Pertusa L., Le D.t.l., Petit J., Nikolova Y., Banon S. & Gaiani C. (2015). Recent advances on lactose intolerance: Tolerance thresholds and currently available answers. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 57(15): 3344-3356.
- Iqbal S., Nguyen T.H., Nguyen T.T., Maischberger T. & Haltrich D. (2010). β -Galactosidase from *Lactobacillus plantarum* WCFS1: biochemical characterization and formation of prebiotic galactooligosaccharides. *Carbohydrate research.* 345: 1408-1416.
- Liu X., Koong Lu W., Tian H. & Tian Y. (2011). β -galactosidase with trans glycosylation activity from *Lactobacillus fermentum* K4, American Dairy Science Association. 94(12): 5811-5820.
- Miller G., Jarvis J. & McBean L.D. (1995). Lactose Intolerance Handbook of Dairy Foods and Nutrition. CRC Press, Boca Raton. FL. pp. 187-220.
- Nakayama T. & Amachi T. (1999). Beta-galactosidase, Enzymology. In Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation; Flickinger M.C., Drew S.W., Eds.; John Willey: New York. pp. 1291-1305.
- Nguyen T.H., Splechtna B., Steinböck M., Kneifel W., Lettner H.P., Kulbe K.D. & Haltrich D. (2006). Purification and Characterization of Two Novel -Galactosidases from *Lactobacillus reuteri*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry:* 54: 4989-4998.
- Nguyen T.H., Splechtna B., Krasteva S., Kneifel W., Kulbe K.D., Divne C. & Haltrich D. (2007). Characterization and molecular cloning of a heterodimeric β -galactosidase from the probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* R22. *FEMS Microbiology Letters.* 269: 136-144.
- Nguyen T.T., Nguyen H.A., Lozel Arreola R., Mlynek G., DjinoVIC-Carugo K., Mathiesen G., Nguyen T.H. & Haltrich D. (2012). Homodimeric β -galactosidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus DSM 20081: expression in *Lactobacillus plantarum* and biochemical characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 7: 1713-172.
- Sanders M.E., Merenstein D.J., Reid G., Gibson R. & Robert A. (2019). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nature Reviews Gastroenterology and hepatology.* 16: 605-616.
- Torres D.P.M., Gonc-alves M.P.F., Teixeira J.A. & Rodrigues L.R. (2010). Galacto Oligosaccharides: Production, Properties, Applications, and Significance as Prebiotics. *Comprehensive reviews in food science and food safety.*