

TUYỂN CHỌN VÀ ĐỊNH DANH VI KHUẨN *Bacillus* CÓ KHẢ NĂNG SINH ENZYME β -GALACTOSIDASE CHỊU NHIỆT

Trần Thị Na^{1*}, Nguyễn Hoàng Anh²

¹Học viên cao học K25, Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Email*: nana041092@gmail.com

Ngày gửi bài: 10.08.2017

Ngày chấp nhận: 01.09.2017

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, 160 chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. được phân lập từ dạ cỏ bò, tương ớt, thịt lên men, nước thải nhà máy sữa, sữa chua lên men, lòng non lợn ở các vùng khác nhau ở Việt Nam được dùng để xác định khả năng sinh enzyme β -galactosidase bằng phương pháp sàng lọc trên môi trường nuôi cấy đĩa thạch có bổ sung X-gal. Kết quả cho thấy, 24/160 chủng *Bacillus* spp. có khả năng sinh β -galactosidase, trong đó 6 chủng (NT2.7, NT2.8, DC1, DC2, TO1.1, TO1.8) có màu xanh đậm nhất được tuyển chọn để tiến hành xác định hoạt độ của enzyme. Chủng NT 2.8 có hoạt độ cao nhất đạt 42,4 U/l được sử dụng để kiểm tra tính bền ở nhiệt độ 50°C và 60°C. Kết quả chỉ ra rằng β -galactosidase của chủng *Bacillus* NT 2.8 rất bền ở hai nhiệt độ này, sau 50 giờ ủ ở 60°C hoạt độ của enzyme vẫn còn 50,6% so với hoạt độ ban đầu. Kết quả so sánh trình tự đoạn gen mã hoá 16S rRNA cho thấy chủng NT2.8 là *Bacillus flexus*.

Từ khóa: *Bacillus* spp., β -galactosidase chịu nhiệt.

Selection and Identification of *Bacillus* Producing Enzyme Thermostable β -Galactosidase

ABSTRACT

In this study, 160 strains of *Bacillus* isolated from cow rumens, Chilli sources, fermented meats, dairy industry effluent, fermented milk, pig small intestine in different areas of Vietnam were used to screen strains of interest producing β -galactosidase on agar plate supplemented Xgal. The data indicated that 24/160 isolated *Bacillus* spp produced β -galactosidase, in which 6 strains (NT2.7, NT2.8, DC1, DC2, TO1.1, TO1.8) with heavy blue colour were used to determine enzyme activity. β -galactosidase from NT2.8 with highest activity 42.4 U/l was tested thermostability at 50°C and 60°C. Results showed that β -galactosidase was very stable at these two temperatures, after 50 hours of 60°C incubation, enzyme activity was still remained 50.6%. Strain NT2.8 was identified to be *Bacillus flexus* based on the comparison of sequence encoding for 16rRNA gene.

Keywords: *Bacillus* spp., thermostable β -galactosidase.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Enzyme β -galactosidase còn được gọi là lactase, là enzyme xúc tác cho quá trình thủy phân lactose thành glucose và galactose (Davail *et al.*, 1994). Nhờ khả năng phân giải lactose mà β -galactosidase được sử dụng nhiều cho ngành công nghiệp thực phẩm, đặc biệt là trong ngành

công nghiệp chế biến sữa và các sản phẩm từ sữa. β -galactosidase được sử dụng để thủy phân lactose nhằm làm tăng khả năng tiêu hóa sữa cho người bị dị ứng với lactose, cải thiện các chức năng của các sản phẩm từ sữa, bổ sung vào quá trình lên men bơ sữa để tránh sự kết tinh lactose và tăng độ ngọt của sản phẩm. Ngoài ra trong y dược, chúng được sử dụng làm thuốc trợ

tiêu hóa cho những người thiếu khả năng hấp thụ lactose (Trương Nam Hải, 2004). Enzyme β -galactosidase có khả năng chịu nhiệt đóng vai trò quan trọng trong quá trình thủy phân lactose ở các sản phẩm chế biến nhiệt độ cao và các sản phẩm sữa lên men. Sữa đã được thủy phân lactose được sử dụng cho việc chế biến hương liệu, phô mai và sữa chua. Sự thủy phân lactose trong sữa sẽ ngăn ngừa sự kết tinh lactose khi chế biến các sản phẩm sữa cô đặc, các sản phẩm sữa cần gia nhiệt. Hơn nữa việc sử dụng β -galactosidase có khả năng hoạt động ở nhiệt độ cao trong sản xuất sữa và các sản phẩm từ sữa làm tăng hương vị cho sản phẩm (Parmjit *et al.*, 2010).

β -galactosidase có thể tìm thấy ở động vật, thực vật, nấm men, nấm mốc và vi khuẩn. Trong đó, enzyme thu nhận từ vi khuẩn ưu việt hơn cả vì vi khuẩn có sinh khối nhỏ, sinh sản nhanh, nhưng tỉ lệ enzyme trong tế bào lớn. Mặt khác, môi trường dinh dưỡng để nuôi cấy vi khuẩn lại rẻ tiền, dễ kiếm nên quy trình sản xuất chế phẩm enzyme khá dễ dàng, hiệu suất thu hồi cao và ít tốn kém (Ngô Xuân Mạnh và *cs.*, 2006).

Trong các loài vi khuẩn được nghiên cứu và sản xuất β -galactosidase, vi khuẩn *Bacillus* được các nhà khoa học nghiên cứu nhiều bởi đây là loài vi khuẩn sinh bào tử, phân bố nhiều trong tự nhiên, tồn tại được trong các điều kiện khác nhau, nhiều loài được coi là an toàn trong thực phẩm. Thêm vào đó *Bacillus* thường sinh enzyme ngoại bào cho nên dễ dàng thu nhận enzyme ở quy mô công nghiệp, mặt khác các enzyme ngoại bào của vi khuẩn này có đặc tính cao và khả năng sinh enzyme chịu nhiệt cao hơn so với các enzyme ngoại bào của những vi sinh vật khác (Đặng Thị Thu và *cs.*, 2007). Cho đến nay trên thế giới và Việt Nam đã có nhiều công trình tuyển chọn vi khuẩn *Bacillus* có khả năng sinh β -galactosidase nhưng việc nghiên cứu và đưa vào ứng dụng sản xuất của β -galactosidase có đặc tính chịu nhiệt còn rất hạn chế.

Từ những cơ sở trên, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu tuyển chọn được chủng *Bacillus* sinh enzyme β -galactosidase chịu

nhệt, làm cơ sở cho ứng dụng vào việc chế biến một số loại thực phẩm chứa lactose.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

160 chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. phân lập từ dạ cỏ bò, tương ớt, thịt lên men, nước thải nhà máy sữa, sữa chua lên men, lòng non lợn ở các vùng khác nhau đã được định danh sơ bộ bằng phương pháp hình thái, sinh hoá được sử dụng để tuyển chọn chủng sinh enzyme β -galactosidase chịu nhiệt.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Cấy giống để thu enzyme ngoại bào

Phương pháp cấy giống để thu enzyme ngoại bào được tiến hành theo Nguyễn Lâm Dũng và *cs.* (1978) và được tóm tắt như sau: Tiếp giống 1% từ ống nghiệm đã hoạt hóa vào bình tam giác chứa môi trường NB có bổ sung 1% đường lactose đã hấp khử trùng ở 121°C trong 15 phút và nuôi cấy ở 37 °C, lắc 200 vòng/phút trong 24 h. Tiến hành li tâm 6.000 vòng/phút ở 4°C trong 20 phút, gạn lấy phần dịch nổi và bảo quản ở 4°C để xác định khả năng sinh enzyme β -galactosidase.

2.2.2. Xác định khả năng sinh β -galactosidase bằng phương pháp nhỏ dịch trên đĩa thạch

Khả năng sinh β -galactosidase của các chủng *Bacillus* được xác định theo phương pháp của Nakayama và Amachi (1996).

Cách tiến hành: Môi trường NA được hấp vô trùng và làm nguội, sau đó bổ sung 60 μ l X-gal nồng độ 20 mg/ml và 10 μ l IPTG 0,1 M trên mỗi đĩa, trang đều. Hút 3 μ l dịch khuẩn (đã chuẩn bị ở mục 2.2.1) nhỏ trên bề mặt đĩa thạch chỉ thị, để khô dịch khuẩn trong 5 phút trước khi ủ ở nhiệt độ 37°C, trong điều kiện tối. Kiểm tra kết quả sau 24 h, 48 h và 72 h.

2.2.3. Xác định hoạt độ của β -galactosidase ngoại bào

Hoạt độ của β -galactosidase xác định bằng cách sử dụng o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside

(oNPG) làm cơ chất như mô tả bởi Nguyen *et al.* (2006): dịch enzyme ngoại bào (đã chuẩn bị như ở mục 2.2.1) được cô đặc 10 lần bởi màng cô đặc có kích thước 10 kDa. Phản ứng enzyme - cơ chất được bắt đầu bằng cách thêm 20 μ L mẫu enzyme vào 480 μ L 22 mM oNPG pha trong đệm 50 mM 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 0,4 M Na_2CO_3 , o-nitrophenol (oNP) tạo ra được xác định bằng cách đo độ hấp thụ ở 420 nm. Một đơn vị hoạt độ của β -galactosidase được định nghĩa là lượng enzyme giải phóng 1 μ mol oNP/phút trong các điều kiện phản ứng nêu trên.

2.2.4. Xác định khả năng chịu nhiệt của enzyme β -galactosidase

Độ bền nhiệt của enzyme β -galactosidase được xác định theo phương pháp của Nguyen *et al.* (2012): Dịch enzyme β -galactosidase thô được ủ ở nhiệt độ 30°C, 50°C, 55°C, 60°C. Tại các thời gian ủ khác nhau, enzyme lấy ra để xác định hoạt độ (theo phương pháp mô tả ở mục 2.2.3). Độ bền nhiệt của enzyme được xác định bằng cách so sánh tỷ lệ (%) hoạt độ còn lại của enzyme tại thời điểm đo với thời điểm bắt đầu ủ.

2.2.5. Định danh chủng được tuyển chọn bằng phương pháp xác định trình tự gen 16S rRNA

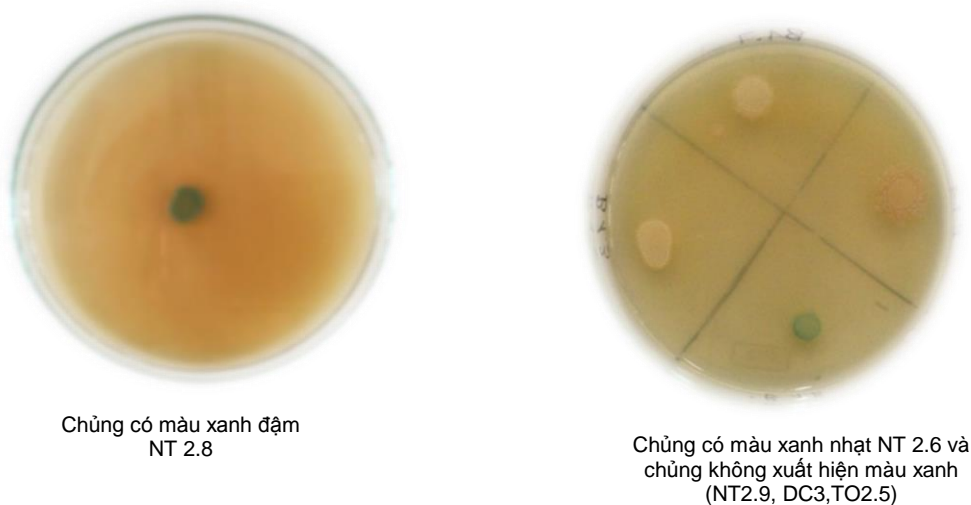
Chủng vi khuẩn sinh β -galactosidase chịu nhiệt có gene mã hóa cho vùng 16S rRNA của chủng *Bacillus* được nhân lên bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi 27F(5'AGAGTTTGATCCTGG CTCAG3') và 1492R (5'-GGTTACCTTGTTA CG ACTT - 3') sau đó được xác định trình tự gen và so sánh mức độ tương đồng di truyền với các loài trên ngân hàng gen NCBI bằng công cụ BLAST theo phương pháp của Chen *et al.* (2008).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả sàng lọc các chủng *Bacillus* có hoạt độ protease

Từ 160 chủng vi khuẩn *Bacillus* sử dụng trong nghiên cứu có 26 chủng vi khuẩn có khả năng thủy phân X-gal, tạo khuẩn lạc màu xanh, mức độ đậm nhạt của màu sắc và thời gian xuất hiện màu xanh của khuẩn lạc được thể hiện ở hình 1 và bảng 1.

Kết quả ở bảng 1 cho thấy trong 26 chủng có hoạt độ β -galactosidase có 6 chủng là NT2.7, NT2.8, DC1, DC2, TO1.1 và TO1.8 cho màu xanh đậm được coi là các chủng vi khuẩn có khả năng sinh enzyme β -galactosidase cao. Chủng có màu sắc đậm nhất là chủng NT2.8. 6 chủng này được sử dụng để tiếp tục đi xác định hoạt độ của enzyme.



Hình 1. Màu của khuẩn lạc khi thủy phân X-gal của chủng minh họa (NT2.8, NT2.6, NT 2.9)

Bảng 1. Kết quả định tính thủy phân X-gal của vi khuẩn *Bacillus*

STT	Ký hiệu chủng	Mức độ màu sắc	STT	Tên chủng	Mức độ màu sắc
1	NT2.6	+	14	TO2.10	+
2	NT2.7	+++	15	TO3.10	+
3	NT2.8	++++	16	TO4.5	++
4	DC1	+++	17	TO5.5	++
5	DC2	+++	18	TO6.1	++
6	DC6	++	19	TO6.6	+
7	DC2.6	+	20	TO7.1	+
8	DC4.8	+	21	TO7.2	+
9	DC5.3	+	22	TO7.3	+
10	TO1.1	+++	23	TO8.6	+
11	TO1.8	+++	24	TO9.9	+
12	TO2.4	+	25	TO10.1	+
13	TO2.6	+	26	TO10.6	+

Chú thích: DC, TO, NT mã hoá lần lượt cho các mẫu phân lập từ dạ cỏ bò, tương ớt và nước thải nhà máy sữa

3.2. Xác định hoạt độ của enzyme β -galactosidase của vi khuẩn

Kết quả xác định hoạt độ β -galactosidase của 6 chủng được thể hiện ở bảng 2.

Kết quả bảng 2 cho thấy trong 6 chủng vi khuẩn được chọn để xác định hoạt độ β -galactosidase thì chủng *Bacillus* NT2.8 cho hoạt độ cao, nổi trội nhất và đạt 42,4 U/l. Kết quả xác định khả năng sinh β -galactosidase bằng phương pháp đĩa thạch có sự tương đồng với phương pháp xác định hoạt độ của enzyme. Chủng vi khuẩn *Bacillus* NT2.8 được sử dụng cho nghiên cứu tiếp theo.

3.3. Xác định đặc tính của β -galactosidase từ chủng vi khuẩn *Bacillus* NT2.8

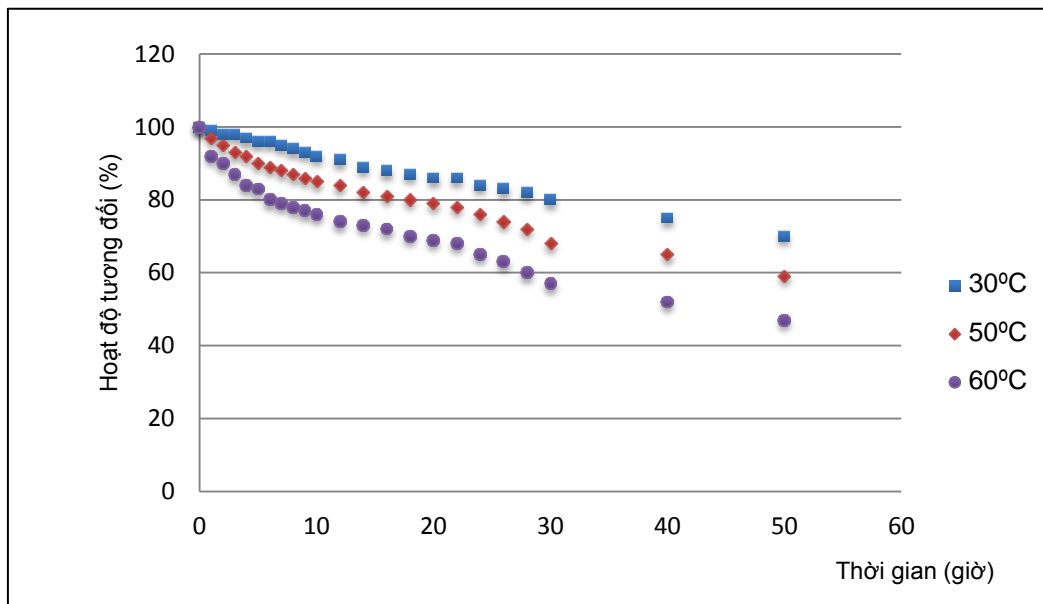
3.3.1. Xác định vi khuẩn *Bacillus* sinh β -galactosidase thủy phân có đặc tính chịu nhiệt

Nhiệt độ có tác động mạnh mẽ tới độ bền của enzyme, gây ảnh hưởng đến hoạt độ xúc tác của enzyme. Dịch enzyme thô được ủ ở nhiệt độ 30°C, 50°C và 60°C trong vòng 50 giờ, ở thời gian 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ,... 50 giờ enzyme thô được lấy ra để xác định độ bền nhiệt như mô tả ở mục 2.2.3. Kết quả được thể hiện ở hình 2.

Kết quả ở hình 2 so sánh độ bền của enzyme ở nhiệt độ 30°C, 50°C và 60°C. Hoạt độ của enzyme bền nhất ở 30°C, giảm dần khi nhiệt độ tăng lên và thấp nhất ở 60°C. Mặc dù vậy, kết quả cho thấy enzyme cũng rất bền ở 60°C. Cụ thể, sau 4 giờ ủ ở 60°C hoạt độ enzyme còn lại là 80,3% so với hoạt độ ban đầu, hoạt độ của enzyme giảm chậm trong suốt 50 giờ ủ và còn lại 50,6% so với hoạt độ đầu tiên sau 50 giờ. So sánh với nhiệt độ 50°C, hoạt độ của enzyme ở 50 giờ còn lại là 71% cao hơn so với hoạt độ enzyme ở nhiệt độ 60°C. Từ kết quả trên ta có thể kết luận chủng vi khuẩn *Bacillus* NT2.8 có khả năng sinh enzyme β -galactosidase rất bền ở nhiệt độ nghiên cứu, kể cả ở 60°C. Kết quả này tương tự kết quả của Chen *et al.* (2008) khi nghiên cứu tính bền nhiệt của β -galactosidase từ vi khuẩn chịu nhiệt *Bacillus stearothermophilus*, ở 60°C trong 50 giờ thì hoạt độ enzyme vẫn giữ được 50% so với hoạt độ ban đầu. Nghiên cứu của Shaikh *et al.* (1999) chỉ ra enzyme β -galactosidase sinh ra từ nấm ưa nhiệt *Rhizomucor* sp. có khả năng bền ở nhiệt độ 60°C trong vòng 4 giờ, hoạt độ enzyme còn lại 50% so với ban đầu trong 2,5 giờ. Kết quả này cho thấy β -galactosidase từ vi khuẩn *Bacillus* NT2.8 có khả năng bền nhiệt cao hơn rất nhiều so với β -galactosidase từ *Rhizomucor* sp.

Bảng 2. Kết quả xác định hoạt độ β -galactosidase ngoại bào của 6 chủng vi khuẩn

STT	Tên chủng	U/L dịch nuôi
1	NT2.8	42,4
2	NT2.7	5,4
3	DC1	5,3
4	DC2	6,2
5	TO1.1	5,2
6	TO1.8	6,5



Hình 2. Độ bền nhiệt của β -galactosidase từ chủng *Bacillus* NT2.8 ở 30, 50 và 60°C

3.4. Định danh chủng được tuyển chọn bằng phương pháp xác định trình tự gen 16S rRNA

Kết quả định tính, định lượng và kiểm tra các đặc tính của enzyme cho thấy vi khuẩn *Bacillus* NT2.8 có khả năng sinh enzyme β -galactosidase cao, chịu nhiệt ở 60°C. Vì vậy, chủng này tiếp tục được định danh bằng phương pháp sinh học phân tử.

3.4.1. Kết quả tách chiết DNA tổng số

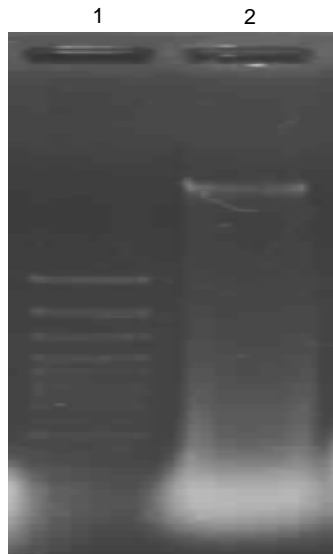
DNA tổng số sau khi tách chiết được kiểm tra độ tinh sạch bằng cách chạy điện di agarose. Kết quả ở hình 3 cho thấy mẫu tách chiết chỉ

xuất hiện một vạch lớn hơn so với thang DNA chuẩn, khẳng định DNA tổng số sạch, có thể sử dụng cho chạy phản ứng PCR tiếp theo.

3.4.2. Kết quả PCR với cặp môi 27F/1492R

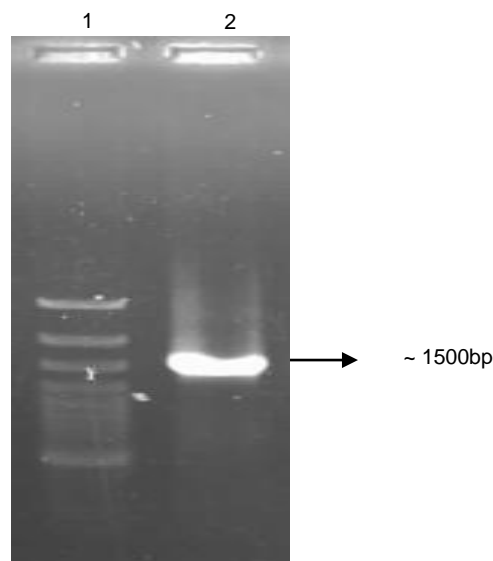
Để định danh chính xác chủng vi khuẩn *Bacillus* NT2.8 được phân lập từ nước thải nhà máy sữa, phản ứng PCR được thực hiện với cặp môi 27F và 1492R để nhân toàn bộ vùng gen mã hóa tiểu phần 16S RNA ribosome. Kết quả PCR được thể hiện trong hình 4.

Kết quả PCR cho thấy mẫu vi khuẩn NT2.8 tạo băng sản phẩm ~ 1.500 bp đúng như dự kiến. Sản phẩm PCR được tinh sạch và sử dụng làm khuôn để giải trình tự gene.



Hình 3. Phổ điện di DNA tổng số tách chiết từ sinh khối vi khuẩn chủng *Bacillus* NT2.8

Ghi chú: Giếng số 1: Thang DNA chuẩn 100 bp DNA ladder, New England Biolabs; Giếng số 2: DNA tổng số tinh sạch



Hình 4. Phổ điện di sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen 16S rRNA từ DNA tổng số chủng vi khuẩn *Bacillus* NT2.8

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

3.4.3. Kết quả xác định trình tự đoạn gen 16S rRNA

Trình tự thu được từ vùng gen mã hóa 16S rRNA có kích thước 1500 bp, tín hiệu rõ không nhòe, không bị trùng các đỉnh tín hiệu. Sau khi

tiến hành xử lý các tín hiệu nhiễu, trình tự đoạn gen được so sánh trên ngân hàng Gen (Genebank) sử dụng công cụ BLAST. Kết quả so sánh trình tự cho thấy *Bacillus* NT2.8 được phân lập từ nước thải nhà máy sữa là vi khuẩn *Bacillus flexus* và được đặt tên là *Bacillus flexus*

NT2.8. *Bacillus flexus* thường được phân lập từ đất nuôi gia cầm, đất tự nhiên, nhiệt độ phát triển từ 17 - 37°C, nhiệt độ phát triển tối ưu 30°C, khoảng pH phát triển từ 4,5 - 9,5 với nồng độ muối từ 2 - 10%. Nghiên cứu của Francois et al (2014) đã chỉ ra rằng vi khuẩn *Bacillus flexus* XJX-1 có khả năng sinh đồng thời các enzyme amylase kiềm, lipase kiềm và protease kiềm, ứng dụng trong công nghiệp chất tẩy rửa. Cho đến nay, chưa có một nghiên cứu nào công bố về vi khuẩn *Bacillus flexus* có khả năng sinh β -galactosidase bền nhiệt.

4. KẾT LUẬN

24/160 chủng vi khuẩn phân lập từ dạ cỏ bò, tương ớt, thịt lên men, nước thải nhà máy sữa, sữa chua lên men, lòng non lợn có khả năng sinh enzyme β -galactosidase. Trong đó, chủng NT2.8 phân lập từ nước thải nhà máy sữa được định danh và đặt tên là *Bacillus flexus* NT2.8 sinh enzyme β -galactosidase có hoạt độ cao (42,4 U/L dịch nuôi), bền nhiệt ở 60°C (sau 50 giờ ủ ở 60°C còn 50,6% so với hoạt độ ban đầu). Enzyme β -galactosidase cần tiếp tục được nghiên cứu tiếp theo để ứng dụng trong công nghiệp sản xuất các loại thực phẩm từ nguồn nguyên liệu có chứa lactose.

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.

Đặng Thị Thu, Nguyễn Văn Cách, Bùi Thị Hải Hòa (2007). Tuyển chọn và nghiên cứu điều kiện lên men sinh tổng hợp β -galactosidase từ chủng nấm mốc *Aspergillus oryzae*. Tạp chí Khoa học và công nghệ, 45(1): 23-31

Davail, S., Feller, G., Narinx, E., Gerday, C. (1994). Cold adaptation of protein. J Biol Chem., 269.

Francois N, N., Sunils S, M. (2014). Concomitant production of detergent compatible enzymes by *Bacillus flexus* XJX-1. Braz. J. Microbiol., 45(3): 903-910.

Nakayama, T., Amachi, T. (1999). β -galactosidase, enzymology. Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation, 3: 1291-1305.

Ngô Xuân Mạnh, Võ Nhân Hậu, Nguyễn Thị Tú (2006). Nghiên cứu các điều kiện tối ưu cho việc thu nhận α -amylase chịu nhiệt từ vi khuẩn *Bacillus licheniformis*. Tạp chí Khoa học và Nông nghiệp, 5(1): 412-416.

Nguyễn Lâm Dũng, Đoàn Xuân Mượu, Nguyễn Phùng Tiến, Đặng Đức Trạch, Phạm Văn Ty (1978). Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội. Tập 3.

Nguyen, H A., Nguyen, T H., Kren, V., Eijsink, V G H., Haltrich, D., Peterbauer, C K. (2012). Heterologous Expression and Characterization of an N-Acetyl- β -D-hexosaminidase from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403, J. Agricultural and food chemistry, 60(12): 3275-81.

Nguyen, TH., Splechna, B., Steinböck, M., Kneifel, W., Lettner, H.P., Kulbe, K.D., Haltrich, D. (2006). Purification and Characterization of Two Novel β -Galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. J. Agricultural and food chemistry, 54: 4989-4998.

Parmjit S, P., Shweta, K., Reeba, P. (2010). Potential Applications of Immobilized β -galactosidase in Food Processing Industries. *Enzyme Research*.

Shaikh, SA., Khire, JM., Khan, MI. (1999). Characterization of a thermostable extracellular beta-galactosidase from a thermophilic fungus *Rhizomucor* sp. Biochim Biophys Acta., 1472: 314-322.

Trương Nam Hải (2004). Nghiên cứu, phân lập và tạo chủng giống bằng kỹ thuật di truyền để sinh tổng hợp enzyme beta-galactosidase có hiệu suất cao và ứng dụng trong thực phẩm. Báo cáo tổng kết khoa học và kỹ thuật.