PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ SƠ BỘ KHẢO SÁT ĐẶC TÍNH VI KHUẨN CHỊU MẶN CÓ KHẢ NĂNG PHÂN GIẢI PROTEIN TỪ DỊCH CHƯỢP MẮM TRUYỀN THỐNG NAM Ô

ISOLATION, SCREENING, AND PRELIMINARY CHARACTERIZATION OF SALT-TOLERANT BACTERIA WITH THE PROTEOLYTIC ABILITY FROM TRADITIONAL NAM-O FISH SAUCE

Nguyễn Trần Mỹ Hoàng[1], Vũ Thuỳ Dương[2]*, Trần Thị Thanh Thủy[2], Phan Thị Thu Hà[1], Nguyễn Khánh Đô[1], Trương Văn Huy Hoàng[1], Ngô Thái Bích Vân[1]*, Phạm Châu Huỳnh[2]*

[1]Trường Đại học Bách khoa - Đại học Đà Nẵng, Việt Nam
[2]Trung tâm Công nghệ Sinh học Đà Nẵng, Việt Nam

*Tác giả liên hệ / Corresponding author: duongvt@danang.gov.vn; ntbvan@dut.udn.vn; huynhpc@danang.gov.vn

(Nhận bài / Received: 26/5/2023; Sửa bài / Revised: 23/5/2024; Chấp nhận đăng / Accepted: 27/5/2024)

Tóm tắt - Nghiên cứu này nhằm phân lập và tuyển chọn các dòng vi khuẩn chịu mặn có khả năng phân giải protein mạnh từ dịch chượp lên men nước mắm tại hai cơ sở sản xuất lớn của Làng nghề nước mắm truyền thống Nam Ô (thành phố Đà Nẵng). Qua việc phân lập trong điều kiện hiếu khí, đã thu được 79 dòng vi khuẩn. Bằng phương pháp cấy vạch và khuếch tán trên đĩa thạch, 11 dòng được xác định có khả năng sinh protease mạnh, với kích thước vòng phân giải sữa gầy >15mm. Cả 11 dòng này cho thấy, khả năng tăng trưởng và sản sinh protease tốt trong môi trường lỏng chứa 4,0w% NaCl, và 3 trong số chúng giữ được khả năng này trong môi trường có 20,0w% NaCl. Kết quả khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến sự phát triển cho thấy, điều kiện thích hợp để thu sinh khối của các dòng này là nhiệt độ 37°C, và thời gian 16-20 giờ. Kết quả giải trình tự gene 16S rRNA cho phép định danh 3 dòng vi khuẩn này thuộc chi *Bacillus*.

Từ khóa - Phân lập; protease; nước mắm; Nam Ô

Abstract - This study aimed to isolate and select salt-tolerant bacterial strains with strong proteolytic ability from fish sauce fermentation broth at two major manufacturers in the Nam-O Traditional Fish Sauce Village (Danang City). By isolation under aerobic conditions, 79 bacterial strains were obtained. Using the streak culture and agar plate diffusion methods, 11 strains were identified as having strong proteolytic activity with a clear zone diameter of >15mm. All 11 strains showed good growth and protease production in liquid media containing 4.0w% NaCl, and three of them retained this ability in media with 20.0w% NaCl. The survey of growth factors showed that, the appropriate conditions for biomass production of these strains were a temperature of 37°C and a culture period of 16-20 hours. Sequencing of the 16S rRNA gene allowed the identification of three bacterial strains belonging to the *Bacillus* genus.

Key words - Isolate; protease; fish sauce; Nam O

1. Đặt vấn đề

Nước mắm của Việt Nam thuộc một nhóm thực phẩm lên men truyền thống, dạng dịch thể, thu được từ quá trình lên men mặn của hải sản (thường là cá cơm, cá nục…), hiện được dùng phổ biến tại các quốc gia vùng Đông Nam Á và một phần Đông Á [1]. Tại Việt Nam, nước mắm là một gia vị phổ biến, cũng là một đặc trưng của văn hoá ẩm thực của dân tộc, hiện diện trong từng bữa ăn gia đình, là linh hồn của các món ăn như một loại gia vị thiết yếu. Theo phương pháp sản xuất nước mắm thương phẩm hiện nay, có thể chia thành hai dòng chính: nước mắm truyền thống và nước mắm công nghiệp. Dòng sản phẩm truyền thống mang hương vị thơm ngon đặc trưng, tuy nhiên có giá thành cao do thời gian sản xuất dài (từ 6 tháng đến 1 năm, hoặc có thể lâu hơn) [2], [3]. Theo số liệu của Tổng cục Thống kê năm 2016, mỗi năm thị trường Việt Nam tiêu thụ khoảng 200 triệu lít nước mắm, trong đó nước mắm truyền thống chỉ chiếm ¼ thị phần [4]. Với sự thay đổi nhanh chóng về mọi mặt của xã hội đương đại, nếu các giá trị độc đáo của nước mắm không được phát huy, và công nghệ sản xuất chậm được chuẩn hoá, thì nước mắm truyền thống sẽ có thể dần mai một.

Tại thành phố Đà Nẵng, nghề sản xuất nước mắm có thể đã bắt đầu từ hàng nghìn năm trước bởi người Champa, và đã được tiếp biến bởi người Việt từ hàng trăm năm nay. Hiện nay, Làng nghề truyền thống nước mắm Nam Ô tại phường Hoà Hiệp Nam (quận Liên Chiểu, Tp. Đà Nẵng) là một di sản của dòng lịch sử - văn hoá đặc biệt nói trên.

Mặc dù nước mắm Nam Ô đã từng là một sản phẩm trứ danh của xứ Quảng, làng nghề hiện đối mặt với nhiều khó khăn trong sản xuất và phát triển thị trường do khó cạnh tranh về giá với nước mắm sản xuất bằng phương pháp công nghiệp.

Một trong những giải pháp giúp giảm chi phí sản xuất nước mắm là phát triển và áp dụng các chế phẩm vi sinh vật phân giải protein của cá, và (hoặc) thời gian hoàn thiện hương vị của mẻ chượp. Chẳng hạn, đã có công bố cho thấy, nhờ áp dụng chế phẩm chứa vi khuẩn *Bacillus megaterium* KLP-98, thời gian lên men nước mắm có thể được rút ngắn từ hơn 1 năm xuống còn 6 tháng [3], [4]. Tại Việt Nam, một nghiên cứu trên các chượp mắm ở Cát Hải (Hải Phòng) và Cửa Hội (Nghệ An) đã thu được chủng vi khuẩn *Tetragenococcus halophilus* chịu được độ mặn cao và giúp hoàn thành thời gian

[1] The University of Danang - University of Science and Technology, Vietnam (Nguyen Tran My Hoang, Phan Thi Thu Ha, Nguyen Khanh Do Truong Van Huy Hoang, Ngo Thai Bich Van)
[2] Danang Biotechnology Center, Vietnam (Vu Thuy Duong, Tran Thi Thanh Thuy, Pham Chau Huynh)

lên men tạo hương nước mắm trong 6 tháng, thay vì 9 tháng trong điều kiện lên men thông thường [5], [6].

Nghiên cứu này nhằm thu nhận các dòng vi sinh vật chịu mặn có hoạt lực phân giải protein mạnh từ hệ vi sinh vật trong các dịch chượp lên men nước mắm theo phương pháp truyền thống của làng nghề nước mắm Nam Ô. Đồng thời, nghiên cứu cũng bước đầu đánh giá một số đặc điểm của các dòng này để làm cơ sở xác lập điều kiện kỹ thuật cho việc sản xuất sinh khối, chế phẩm vi sinh từ đó, và cách thức ứng dụng các chế phẩm này nhằm rút ngắn thời gian ủ chượp mắm, trong khi vẫn cơ bản bảo tồn kỹ thuật sản xuất nước mắm truyền thống của làng nghề.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Dịch chượp ủ ở các thời điểm khác nhau được thu nhận ở hai cơ sở tiêu biểu ở làng nghề nước mắm Nam Ô, ký hiệu là B và H. Cơ sở B sử dụng phương pháp lên men 2 pha: gài nén trong 4 tháng đầu và khuấy đảo trong giai đoạn tiếp theo. Cơ sở H lên men theo phương pháp gài nén toàn thời gian.

2.2. Môi trường nuôi cấy vi sinh vật

Môi trường TSA được sử dụng để phân lập vi sinh vật trong mẫu. Thành phần (g/L): tryptone 15 g, peptone đậu nành 5 g, NaCl 5 g, agar 20 g. Các thành phần được hòa tan trong nước, điều chỉnh pH (25°C) đến 7,0 ± 0,2; hấp khử trùng ở 121°C trong 30 phút và bảo quản lạnh 4°C.

Môi trường TSB được sử dụng để tăng sinh và lên men vi khuẩn. Thành phần (g/L): tryptone 17 g; peptone đậu nành 3 g; NaCl 5 g; dextrose (glucose) và K_2HPO_4 2,5 g. Các thành phần được hòa tan trong nước, điều chỉnh pH (25°C) đến 7,0 ± 0,2; hấp khử trùng ở 121°C trong 30 phút, để nguội và bảo quản lạnh ở 4°C.

2.3. Thu mẫu, phân lập và khảo sát sơ bộ các dòng vi sinh vật thuần khiết

Mẫu được thu nhận được từ các chượp đang lên men tại các cơ sở sản xuất. Tại mỗi chượp, mẫu được lấy tại 3 vị trí phân tầng theo chiều cao, sau đó hỗn hợp thành mẫu đại diện cho khối dịch chượp.

Mẫu được pha loãng thập phân bằng dung dịch NaCl 0,9% vô trùng đến độ loãng 10^{-7}. Lấy 0,1 mL dịch huyền phù ở các độ loãng cấy trải trên môi trường TSA, nuôi ở nhiệt độ phòng 30±2°C. Sau 24 giờ, xác định và thu sinh khối các khuẩn lạc độc lập, cấy ria các sinh khối trên các đĩa petri chứa môi trường TSA để thu nhận các dòng thuần.

Khuẩn lạc đơn của các dòng được quan sát và ghi hình ảnh bằng kính hiển vi soi nổi (Optika SZM-1, Ý). Mẫu tế bào cố định sau nhộm Gram được quan sát và ghi hình ảnh bằng kính hiển vi quang học (Euromex BB.4253, Hà Lan) ở vật kính X100.

2.4. Khảo sát khả năng phân giải protein

2.4.1. Phương pháp cấy vạch

Sinh khối từ các khuẩn lạc được và cấy trên đĩa thạch chứa 1,0w% sữa gầy, ủ ở nhiệt độ phòng 30±2°C trong 48 giờ và đánh giá khả năng phân giải protein. Kích thước vòng phân giải (mm) là hiệu số giữa đường kính vòng phân giải và đường kính khuẩn lạc vi khuẩn [7].

2.4.2. Phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch

Các dòng qua tuyển chọn ở Mục 2.4.1 được tăng sinh trên môi trường TSB lỏng ở nhiệt độ phòng, tốc độ lắc 150 vòng/phút, trong 48 giờ. Dịch sau nuôi được ly tâm ở 3600 vòng/phút trong 15 phút. Thu và lọc dịch trong sau ly tâm bằng lọc chân không để được dịch enzyme thô. Nhỏ 800 µL dịch enzyme thô vào các giếng trên đĩa thạch chứa 1,0w% sữa gầy, ủ ở 8°-10°C trong 5 giờ, tiếp theo là 30°C trong 48 giờ. Đánh giá hoạt lực protease theo phân cấp kích thước vòng phân giải (D, mm) như sau[8]: 10 mm > D: Yếu (–); 15 mm > D ≥ 10 mm: Trung bình (+); 20 mm > D ≥ 15 mm: Khá (++); D ≥ 20 mm: Mạnh (+++).

2.5. Khảo sát đặc tính sinh trưởng và phân giải protein của các dòng vi sinh vật trong các môi trường mặn

Hầu hết các loại nước mắm có nồng độ muối cao (20,0-25,0 w%), do đó, khả năng sinh trưởng trong môi trường mặn là một tiêu chí quan trọng để chọn vi sinh vật trong nghiên cứu này. Các dòng vi sinh vật thể hiện khả năng phân giải protein mạnh tại Mục 2.4.2 được cho tăng sinh trong các môi trường với hàm lượng NaCl lần lượt là: 0,5w%; 4,0w% và 20,0w%, và lắc với tốc độ 150 vòng/phút, trong 72 giờ. Lấy một khuẩn lạc đơn của các dòng vi khuẩn lựa chọn cho vào trong môi trường lỏng có bổ sung hàm lượng NaCl khác nhau. Sự thay đổi mật độ vi sinh vật trong canh trường nuôi được ước lượng bằng sự thay đổi của mật độ quang tại bước sóng 600 nm (OD_{600nm}) của dịch tương ứng.

Các vi sinh vật trên cũng được khảo sát khả năng phân giải protein trong điều kiện môi trường có độ mặn cao bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch (Mục 2.4.2).

2.6. Định danh vi sinh vật

Các dòng vi sinh vật sinh trưởng tốt và duy trì được hoạt tính phân giải protein trong môi trường độ mặn cao được chọn lọc và thực hiện định danh bằng việc giải trình tự gene 16S rRNA (phương pháp Sanger) và đối chiếu với thông tin tại ngân hàng gen của NCBI (chương trình BLAST).

2.7. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng của các dòng vi sinh vật

Thực nghiệm đã được tiến hành để xây dựng và phân tích đường cong sinh trưởng của vi sinh vật tại các mức nhiệt độ khác nhau. Căn cứ nhiệt độ được cho là thích hợp cho quá trình phân giải protein cá trong lên men nước mắm là khoảng 35°-50°C [9], [10], [11] và nền nhiệt độ các mùa tại Đà Nẵng, các mốc 25°C, 37°C và 45°C đã được chọn để khảo sát.

Trước tiên, một thực nghiệm đã được tiến hành để lập phương trình tương quan giữa OD_{600nm} với mật độ tế bào. Các dòng vi sinh vật trong diện khảo sát được tăng sinh trong môi trường lỏng TSB bổ sung 4,0w% NaCl ở nhiệt độ phòng trong vòng 24 giờ với tốc độ lắc 150 vòng/phút. Sau đó, pha loãng dịch canh trường đến độ loãng 10^{-7} và đo mật độ quang OD_{600nm}. Đồng thời nuôi cấy và đếm số lượng tế bào ở các độ pha loãng tương ứng trên môi trường thạch TSA. Từ kết quả, sử dụng công cụ toán học để thiết lập các hàm tương quan thực nghiệm.

Để xây dựng đường cong sinh trưởng, sinh khối các dòng vi sinh vật được nuôi tĩnh trong 10 mL môi trường lỏng TSB chứa 4,0w% NaCl, ở các mức nhiệt độ 25°C, 37°C, và 45°C. Với mỗi nghiệm thức nhiệt độ, giá trị OD_{600nm} của dịch huyền phù canh trường nuôi cấy được thu

nhận tại các mối thời gian 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 42, 48 giờ kể từ khi phân tán sinh khối vào môi trường nuôi. Sử dụng các phương trình thực nghiệm ở trên để chuyển đổi giá trị OD_{600nm} sang mật độ tế bào trong dịch huyền phù và biểu diễn biến thiên của chúng theo thời gian để thu được đường cong sinh trưởng tương ứng với các dòng vi sinh vật và nhiệt độ khảo sát.

2.8. Xử lý dữ liệu

Mỗi thí nghiệm được lặp lại ba lần. Dữ liệu thực nghiệm được phân tích thống kê với phần mềm SPSS verion 27. Sự khác biệt giữa các kết quả trung bình được đánh giá bằng phân tích ANOVA kết hợp kiểm định Duncan.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Phân lập và tuyển chọn các dòng vi sinh vật có hoạt lực phân giải protein cao

Từ mẫu dịch chượp ủ 6 tháng và 8 tháng của cơ cở B đã phân lập được 40 dòng vi sinh vật (ký hiệu B1-B40); và từ mẫu dịch ủ 10 tháng của cơ sở H đã phân lập được 39 dòng (ký hiệu H1-H39). Qua sàng lọc bằng phương pháp cấy vạch trên môi trường thạch chứa 1,0 w% sữa gầy, đã chọn được 15 dòng B và 10 dòng H cho khả năng phân giải protein nổi trội (D≥8mm) (Bảng 1). Khả năng phân giải protein của 25 dòng này cũng không đồng nhất (p<0,05), trong đó, các dòng B1 (D=15,4±1,32 mm), B16 (D=14,10±1,25 mm), H13 (D=14,89±0,32mm) có hoạt lực mạnh nhất.

Bảng 1. *Khả năng phân giải protein của 25 dòng vi sinh vật qua xác định bằng phương pháp cấy vạch*

STT	Tên dòng	Kích thước vòng phân giải (D, mm)
1	B1	$15,45^{a} \pm 1,32$
2	B2	$11,22^{ef} \pm 0,39$
3	B3	$9,18^{ghkl} \pm 0,92$
4	B4	$12,03^{de} \pm 0,79$
5	B9	$8,92^{hij} \pm 0,92$
6	B11	$13,84^{bc} \pm 0,70$
7	B16	$14,10^{abc} \pm 1,25$
8	B19	$13,36^{bcd} \pm 0,82$
9	B20	$13,31^{bcd} \pm 0,61$
10	B23	$10,59^{bcd} \pm 0,39$
11	B24	$10,26^{ghi} \pm 0,75$
12	B27	$10,73^{efg} \pm 0,53$
13	B28	$9,37^{ghij} \pm 0,53$
14	B30	$11,28^{ef} \pm 0,80$
15	B36	$8,63^{ij} \pm 0,85$
16	H1	$9,11^{ghij} \pm 0,69$
17	H11	$9,26 \pm 0,92$
18	H13	$14,89^{ab} \pm 0,32$
19	H18	$10,68^{efg} \pm 0,77$
20	H19	$13,04^{cd} \pm 0,89$
21	H20	$10,06^{efgh} \pm 0,47$
22	H21	$8,69^{ij} \pm 0,34$
23	H29	$9,17^{ghij} \pm 0,83$
24	H30	$8,69^{ij} \pm 0,82$
25	H32	$8,60^{ij} \pm 0,32$

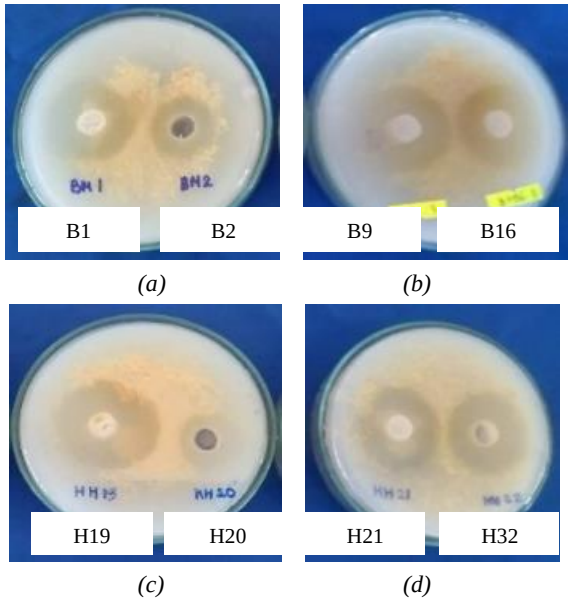
(Các giá trị có chữ cái khác nhau trong cùng một cột là khác nhau có ý nghĩa thống kê ở mức P<0,05 theo phép thử Duncan)

Tiếp tục kiểm tra khả năng phân giải protein của 25 dòng nói trên bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch chứa 1,0w% sữa gầy, và đã tuyển chọn được 11 dòng thể hiện khả năng phân giải protein ưu trội, gồm 7 dòng B và 4 dòng H (Bảng 2). Các dòng này vẫn khác biệt đáng kể về khả năng phân giải protein (p<0,05), trong đó, H19 thể hiện khả năng vượt trội (D=24,17±0,96), tiếp theo là H32, H21, B16, H13, và B3.

Bảng 2. *Khả năng phân giải protein của 11 dòng vi sinh vật qua xác định bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch*

STT	Tên dòng	Kích thước vòng phân giải (D, mm)	Mức độ phân giải
1	B1	$21,38^{bc} \pm 0,44$	+++
2	B3	$19,82^{bcd} \pm 0,99$	+++
3	B4	$16,34^{e} \pm 0,14$	++
4	B9	$19,26^{cd} \pm 1,57$	++
5	B11	$18,09^{de} \pm 0,31$	++
6	B16	$20,06^{bcd} \pm 0,98$	+++
7	B19	$16,17^{e} \pm 1,27$	++
8	H13	$19,90^{bcd} \pm 0,13$	+++
9	H19	$24,17^{a} \pm 0,96$	+++
10	H21	$21,50^{bc} \pm 1,39$	+++
11	H32	$21,67^{b} \pm 0,40$	+++

(Các giá trị có chữ cái khác nhau trong cùng một cột là khác nhau có ý nghĩa thống kê ở mức p<0,05 theo phép thử Duncan).



Hình 1. *Vòng phân giải trên môi trường thạch chứa cơ chất sữa gầy của B1 (trái) so với B2 (phải) (a), B9 (trái) so với B16 (phải) (b), H19 (trái) so với H20 (phải) (c) và H21 (trái) so với H32 (phải) (d)*

3.2. Sinh trưởng của các dòng vi sinh vật trong môi trường mặn

Kết quả đo OD600nm của các canh trường nuôi trong thực nghiệm cho thấy, các dòng vi sinh vật có khả năng sinh trưởng khác nhau trong các môi trường mặn (P<0,05) (Bảng 3). Cụ thể: Ở nồng độ NaCl 0,5w%, chỉ có dòng B3 và B11 có OD600nm khá cao > 0,7; các dòng còn lại đều < 0,6. Ở nồng độ NaCl 4,0w%, hầu hết các dòng đều có OD600nm cao hơn so với ở 0,5w%, đạt khoảng 0,7-1,0; riêng B3 có OD600nm cao nhất (1,187±0,012). Tuy nhiên,

khi nồng độ NaCl tăng lên 20w% thì giá trị OD600nm của tất cả các dòng đều thấp hơn so với hai trường hợp trên, trong đó B3, B11, H32 bị ức chế nhiều nhất. Dù vậy, với môi trường chứa 20w% NaCl, vẫn xác định được một số dòng có khả năng sinh trưởng khá (giá trị $OD_{600nm} \geq 0,150$), trong đó H13 cho OD_{600nm} cao nhất (0,297±0,016), tiếp theo là B16, B19, B4, B1, B9 và H21.

Bảng 3. *Khả năng sinh trưởng của 11 dòng vi sinh vật trong các môi trường mặn*

TT	Tên dòng vi khuẩn	OD_{600nm}		
		0,5w% NaCl	**4,0w% NaCl**	**20,0w% NaCl**
1	**B1**	$0,174^{d}$±0,047	$0,871^{bc}$±0,084	$0,156^{cd}$±0,011
2	**B3**	$1,137^{a}$±0,048	$1,187^{a}$±0,012	$0,083^{ef}$±0,007
3	**B4**	$0,231^{d}$±0,063	$0,688^{bc}$±0,026	$0,170^{de}$±0,035
4	**B9**	$0,261^{d}$±0,034	$0,879^{bc}$±0,058	$0,154^{cd}$±0,005
5	**B11**	$0,769^{b}$±0,082	$0,959^{b}$±0,015	$0,053^{f}$±0,009
6	**B16**	$0,302^{d}$±0,009	$0,731^{c}$±0,099	$0,225^{b}$±0,018
7	**B19**	$0,571^{b}$±0,063	$0,839^{bc}$±0,034	$0,185^{bc}$±0,006
8	**H13**	$0,310^{d}$±0,060	$0,870^{bc}$±0,025	$0,297^{a}$±0,016
9	**H19**	$0,249^{d}$±0,009	$0,965^{b}$±0,049	$0,109^{def}$±0,015
10	**H21**	$0,350^{cd}$±0,047	$0,711^{c}$±0,073	$0,154^{cd}$±0,019
11	**H32**	$0,556^{bc}$±0,057	$1,012^{ab}$±0,051	$0,078^{ef}$±0,002

(Các giá trị có chữ cái khác nhau trong cùng một cột là khác nhau có ý nghĩa thống kê ở mức p<0,05 theo phép thử Duncan).

3.3. Khả năng phân giải protein của các dòng vi sinh vật trong môi trường chứa 20w% NaCl

Các dòng vi sinh vật thể hiện khả năng phân giải protein với sự khác biệt đáng kể trong môi trường có hàm lượng NaCl 20 w% (p<0,05) (Bảng 4). Dù vậy, đa số các dòng vi sinh vật này vẫn duy trì được hoạt lực phân giải protein khá tốt, với kích thước vòng phân giải protein đạt mức ++ (từ 15-20 mm). Các dòng này không chỉ có khả năng chịu mặn cao mà còn duy trì được khả năng sinh enzyme protease để thủy phân protein trong môi trường có nồng độ muối cao, tương đương điều kiện sản xuất nước mắm truyền thống.

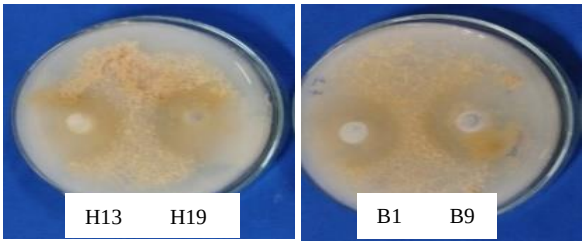
Bảng 4. *Khả năng phân giải protein của 11 dòng vi sinh vật trong môi trường chứa hàm lượng NaCl 20,0w%*

STT	Tên dòng	Kích thước vòng phân giải (D, mm)	Mức độ phân giải
1	**B1**	$16,98^{abc}$±0,31	++
2	**B3**	$15,86^{abc}$±0,80	++
3	**B4**	$15,12^{bcd}$±0,68	++
4	**B9**	$17,71^{ab}$±0,37	++
5	**B11**	$14,47^{cd}$±0,08	++
6	**B16**	$12,58^{d}$±0,86	+
7	**B19**	$9,74^{e}$±0,70	-
8	**H13**	$18,61^{a}$±0,8	++
9	**H19**	$17,78^{ab}$±0,84	++
10	**H21**	$15,78^{bc}$±1,78	++
11	**H32**	$17,33^{ab}$±1,51	++

(Các giá trị có chữ cái khác nhau trong cùng một cột là khác nhau có ý nghĩa thống kê ở mức p<0,05 theo phép thử Duncan).

Trong số 11 dòng được khảo sát, có 3 dòng nổi trội là H13 (D=18,61±0,8mm), B9 (D=17,71±0,37mm) và H19 (17,78±0,84mm). Các dòng này vừa chịu mặn tốt, vừa duy trì được hoạt tính protease cao trong nồng độ muối lên đến 20w% có tiềm năng để phát triển thành các chế phẩm vi sinh ứng dụng trong sản xuất nước mắm truyền thống.

Mặc khác, vẫn có 2 dòng là B16 và B19 bị suy giảm hoạt tính protease đáng kể khi tăng nồng độ muối lên 20 w%, trong đó B19 gần như mất hoàn toàn khả năng phân giải protein (D<10 mm). Điều này cho thấy các chủng khác nhau có khả năng thích nghi và duy trì hoạt động enzyme khác nhau trong điều kiện mặn, cần có các nghiên cứu sâu hơn để lựa chọn được các chủng phù hợp nhất cho từng mục đích ứng dụng cụ thể.

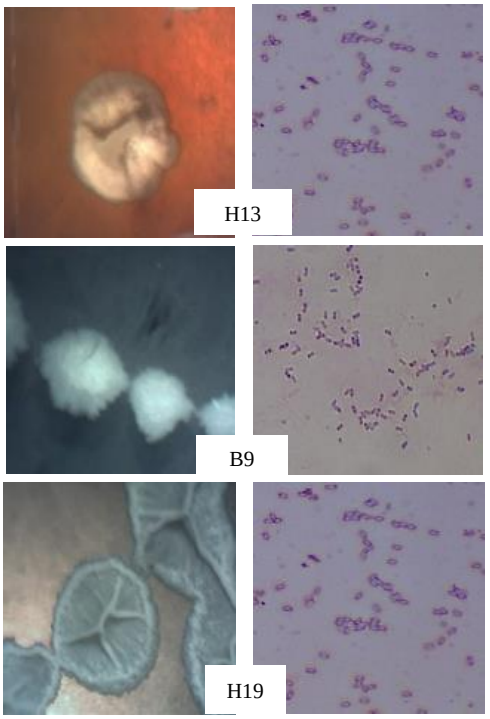


(a) *(b)*

Hình 2. *Khả năng phân giải sữa gầy của dòng H13 (trái) và H19 (phải) (a), dòng B1 (trái) và B9 (phải) (b) ở môi trường chứa nồng độ NaCl 20,0w%*

3.4. Định danh các dòng vi sinh vật

Hình ảnh hiển vi tế bào và kết quả nhuộm Gram các dòng B9, H13, và H19 cho thấy B9 có hình que dài, H13 và H19 hình que ngắn và có bào tử, và cả 3 đều phản ứng Gram dương (Hình 3). Kết quả giải trình tự nucleotide đoạn gen mã hóa 16S rRNA (Hình 4) và so sánh với các trình tự trên ngân hàng gen của NCBI bằng chương trình BLAST (Hình 5) cho thấy cả 3 dòng đều có đoạn gen 16S rRNA tương đồng 100% với các loài thuộc chi *Bacillus*.



Hình 3. *Hình ảnh khuẩn lạc và kết quả nhuộm Gram của H13, B9, và H19*

CCCAATCATCTGTCCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCATAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGC
GGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGA
CTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGCCCATTGTAGCACGTGTGTAG
CCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAAT
GCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTG
TCACTCTGCCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAA
ACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCG
TTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGC
TCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTCACCGCT
ACACGTGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGAC
TTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTTACGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTA
GCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTTGAACGGCACTTGTTCTTCCCTAACAACAGAGCTTTACGATCCGAAA
ACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGT
GTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGC
CGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTCTGAACCATGCGGTTCAAACAACCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTC
CCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTGTCCG
CTCGACTT

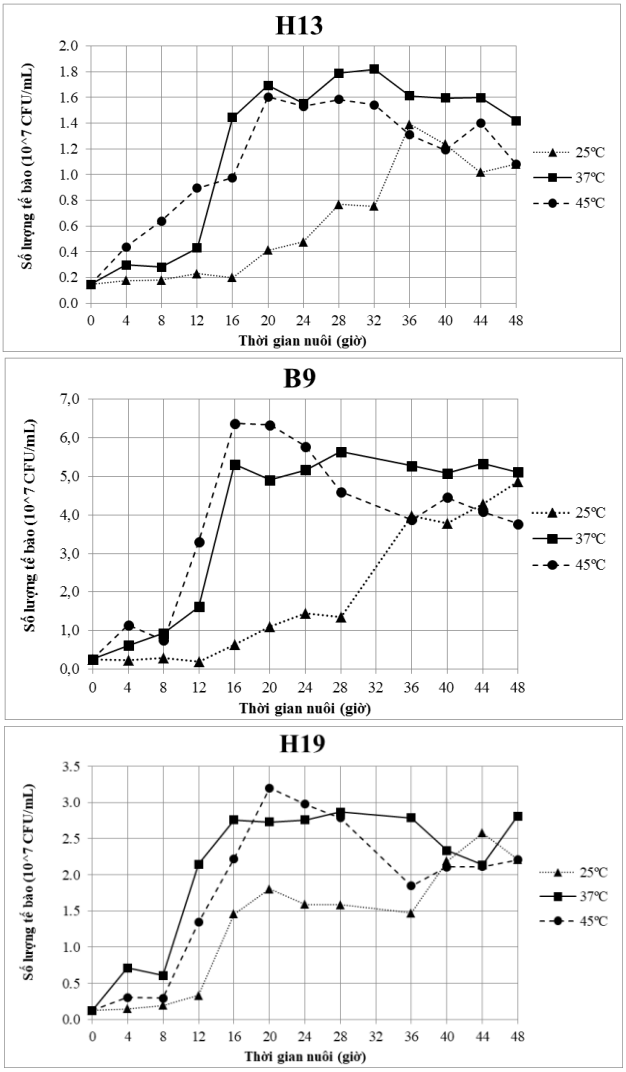
Hình 4. *Trình tự nucleotide gen mã hóa rRNA 16 của H19 được xác định bằng phương pháp Sanger*

Hình 5. *Kết quả so sánh trình tự nucleotide gen mã hóa rRNA 16 của H19 với ngân hàng dữ liệu NCBI*

Như vậy, có thể khẳng định 3 dòng vi sinh vật có khả năng phân giải protein tốt trong nghiên cứu này là vi khuẩn *Bacillus*. Sự hiện diện của vi khuẩn *Bacillus* trong nước mắm cũng đã được khẳng định trong một số công bố. Trong một nghiên cứu về vi khuẩn sinh protease từ nước mắm Việt Nam [3], có 4 chủng được phân lập và chọn lọc thuộc các loài *Bacillus* (cùng 5 chủng *Staphylococcus*). Các chủng *Bacillus* cho thấy khả năng chịu mặn tốt và có hoạt lực protease cao. Trong một nghiên cứu khác [12], 2 chủng thuộc các loài *Bacillus subtilis* và *Lactobacillus plantarum* được phân lập từ nước mắm, và được xác định là có khả năng tạo các hợp chất bay hơi như 2-metyl butanoic acid và 1,3-propanediol, tạo mùi vị đặc trưng cho nước mắm. Bacillus cũng được phát hiện trong dịch lên men mặn của cá cơm tại Hàn quốc [13]. Một công bố từ Ấn độ cho thấy *Bacillus subtilis* có trong nội tạng cá cơm đánh bắt từ biển [14].

3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng của các dòng vi khuẩn

Qua thực nghiệm về tương quan giữa giá trị OD_{600nm} và mật độ tế bào của từng dòng B9, H13 và H19, đã xác định được đó là các phương trình tuyến tính với giá trị hồi quy cao, tương ứng là: $y = 8*10^{-9}x + 0,0248$ ($r^2 = 0,997$), $y = 4*10^{-8}x + 0,0146$ ($r^2 = 0,999$), và $y = 2*10^{-8}x + 0,0047$ ($r^2 = 1,000$). Các phương trình này đã được sử dụng để ước lượng mật độ tế bào dịch canh trường nuôi từ giá trị OD_{600nm} tương ứng, và xây dựng các đường cong sinh trưởng (Hình 6). Kết quả cho thấy, trong miền được khảo sát, nhiệt độ có ảnh hưởng rõ rệt lên sự phát triển của các dòng vi khuẩn. Trong khoảng 37°-45°C, cả 3 dòng nhanh đạt cực đại, trong khi đó, tại 25°C, pha log thể hiện một cách không rõ rệt. Ở 37°C, sau 8 giờ nuôi cấy thì B9 bắt đầu pha log kéo dài trong 8 giờ, sau đó đạt đỉnh tại thời điểm 16 giờ với mật độ khoảng $5,3\times10^7$ tế bào/mL. Cũng tại 37°C, H13 đạt cực đại sau 20 giờ nuôi cấy với mật độ $1,7\times10^7$ tế bào/mL. Đỉnh sinh trưởng của H19 đạt khoảng hơn $3,2\times10^7$ tế bào/mL sau 20 giờ nuôi cấy ở 45°C và khoảng $2,8\times10^7$ tế bào/mL sau 16 giờ nuôi cấy ở 37°C.



Hình 6. *Đường cong sinh trưởng của các dòng B9, H13, và H19 ở các mức nhiệt độ 25°C, 37°C, và 45°C*

Từ các kết quả trên có thể kết luận điều kiện thích hợp để tăng sinh thu sinh khối các dòng B9, H13 và H19 là 37°C và thời gian tăng sinh là 16-20 giờ. Kết quả về nhiệt độ ưu trội này tương đồng với trong công bố ở [15], trong đó, nhiệt độ hoạt động tối ưu của enzyme protease từ nhóm vi khuẩn *Bacillus* được xác định là 37°C.

4. Kết luận

Từ 3 mẫu nước mắm tại hai cơ sở B và H đã phân lập được 79 dòng, (40 dòng từ cơ sở B và 39 dòng từ cơ sở H). Quá trình sàng lọc tuyển chọn được 11 dòng (7 dòng cơ sở B và 4 dòng cơ sở H) thể hiện khả năng phân giải protein tốt trên môi trường thạch cơ chất sữa gầy.

Khảo sát sinh trưởng của các dòng vi khuẩn trên 3 môi trường có hàm lượng NaCl lần lượt là 0,5w%, 4,0w%, và 20,0w%. Kết quả đã xác định được 3 dòng sinh trưởng khá ở hàm lượng muối cao 20,0w%, gồm H13, B9 và H19. Đây là các dòng thể hiện được khả năng sinh trưởng khá và phân giải protein ưu trội trong môi trường có hàm lượng NaCl tương đương của chượp lên men nước mắm truyền thống. Kết quả định danh thông qua giải trình tự gene 16S rRNA, cùng đặc điểm hình thái và phản ứng Gram cho phép xác định cả ba dòng đều thuộc chi *Bacillus*. Khảo sát sinh

trưởng của 3 dòng ở nhiệt độ 25°C, 37°C và 45°C cho thấy nhiệt độ 37°C phù hợp hơn cả cho nuôi cấy thu sinh khối các dòng vi khuẩn. Sinh khối đạt cực đại sau 16 giờ nuôi cấy đối với dòng B9, H19 và sau 20 giờ đối với H13.

Lời cảm ơn: Các tác giả trân trọng cảm ơn UBND thành phố Đà Nẵng đã tài trợ cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] G. Hall, *Fish Processing: Sustainability and New Opportunities.* Wiley-Blackwell, 2010.

[2] K. Lopetcharat, Y. Choi, D. Park, and M. Daeschel, "Fish sauce products and manufacturing: a review", *Food Reviews International*, vol. 17, no. 1, pp. 65–88, 2007, Doi: 10.1081/FRI-100000515.

[3] K. Mura, H. Maeda, H. Tanaka, Y. Koizumi, and F. Yanagida, "Isolation of Protease-productive Bacteria from Fish Sauces Collected in Vietnam", *Food Preservation Science*, vol. 26, no. 5, pp. 263–271, 2000, Doi: 10.5891/jafps.26.263.

[4] X. T. Fu, S. G. You, and S. M. Kim, "Characterization of a salt-tolerant acid protease produced by Bacillus Megaterium KLP-98 and ít potential as a fermentation starter for the manufacture of fish sauce", *Journal of Food Biochemistry*, vol. 32, no. 3, pp. 279–298, 2008.

[5] Ministry of Health, *Circular Guiding the management of food additives*, No 24/2019/TT-BYT, 2019

[6] T. T. Nga, "Isolation of halophilic lactic bacteria Tetragenococcus Halophilus from Vietnamese fish sauce", *Vietnam Journal of Science and Technology*, vol. 55, no. 5A, p. 186, 2018, Doi: 10.15625/2525-2518/55/5a/12194.

[7] W. K. Amoa-Awua, N. N. Terlabie, and E. Sakyi-Dawson, "Screening of 42 Bacillus isolates for ability to ferment soybeans into dawadawa", *International Journal of Food Microbiology*, vol. 106, no. 3, pp. 343–347, Feb. 2006, Doi: 10.1016/j.ijfood micro. 2005. 08.016.

[8] H. D. T. Huong and P. T. Hanh, "Isolation and selection of proteolytic bacteria from slaughterhouse in Thua Thien Hue province", *Proceedings of the National Conference on Biotechnolgy*, Hue, Vietnam, 2020, pp. 420-425.

[9] B.-K. Kim, H.-H. Lee, M.-H. Jeong, Y.-J. Cho, and K.-B. Shim, "Effect of fermentation temperature and salt concentration on the quality of Jack Mackerel (Trachurns japonicus) fish sauce", *Journal of Fisheries and Marine Sciences Education*, vol. 24, no. 6, pp. 755–762, 2012.

[10] Y. Du *et al.*, "Changes in the chemical properties and metabolite profiling of fish sauce prepared from underutilized large yellow croaker roes during fermentation at different temperatures", *Food Research International*, vol. 179, p. 114030, 2024, Doi: https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114030.

[11] P. T. T. Que, "*Textbook on Seafood processing technology*" Can Tho University, 2005.

[12] N. L. Anh, "Health-promoting microbes in traditional Vietnamese fermented foods: A review*", Food Science and Human Wellness*, vol 4, no. 4, p147-161, 2015.

[13] Y. M. Ha, Y. H. Park, and Y. J. Kim, "A taxonomic study of Bacillus sp. isolated from Korean salt-fermented anchovy", *Molecular Biology Today*, vol. 3, No. 1, pp. 25–29, 2001.

[14] T. Bhandary and P. K. Alagesan, "Assessment of bioactivity of the novel exopolysaccharide secreted by Bacillus subtilis isolated from the gut of marine anchovies", *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, vol. 12, no. 1, pp. 205–212, 2024, Doi: 10.7324/JABB.2024.147409.

[15] F. J. Contesini, R. Melo, and H. H. Sato, "An overview of Bacillus proteases: from PRODUCTION to application", *Critical Reviews in Biotechnology*, Vol. 38, pp. 321–334, 2018, [Online]. Available: https://api.semanticscholar.org/CorpusID:3449518.

PHỤ LỤC

Bảng 1. *Giá trị OD ở bước sóng 600nm và mật độ tế bào tương ứng (CFU/ml)*

STT	Mật độ tế bào CFU/mL	OD600
1	57.741.935,48	1,0760
2	5.774.193,55	0,1020
3	577.419,35	0,0170
4	57.741,94	0,0082
5	5.774,19	0,0078
6	577,42	0,0064