

PHÂN LẬP VÀ NGHIÊN CỨU VI KHUẨN ƯA MUỐI, ƯA KIỀM SINH ENZYME PROTEASE VÀ BƯỚC ĐẦU THỬ NGHIỆM ĐỂ SẢN XUẤT NƯỚC MẮM NGẮN NGÀY

Isolation and Characterization of Halophilic Alkaliphilic Bacteria Producing Protease and their Use to Accelerate Fish Sauce Fermentation

Nguyễn Văn Lâm¹, Nguyễn Phương Huệ², Trịnh Thị Ngọc^{1,3}

¹*Khoa Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội*

²*Viện Công nghệ Sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

³*Công ty TNHH ANT (HN), Khu Công nghiệp Tân Trường, Cẩm Giàng, Hải Dương*

Địa chỉ email tác giả liên lạc: nvlamcntp@hva.edu.vn; nhuecnsh73@yahoo.com

Ngày gửi đăng: 27.04.2011; Ngày chấp nhận: 20.06.2011

TÓM TẮT

Vi khuẩn ưa muối và ưa kiềm sinh enzyme protease có vai trò quan trọng trong công nghiệp thực phẩm như sử dụng để sản xuất nước mắm ngắn ngày. Trong thí nghiệm này, 449 chủng vi khuẩn ưa kiềm đã được phân lập từ 56 mẫu nước và mẫu bùn từ các vùng ven biển, trong đó có 190 chủng sinh protease. Ba chủng 2.2, 2.20 và 18.2 có khả năng sinh tổng hợp protease cao, đặc biệt là chủng 2.2 có khả năng sinh trưởng tốt ở nồng độ muối 3-4% và khả năng sinh tổng hợp protease cao nhất. Kết quả nghiên cứu đặc điểm của enzyme protease của chủng 2.2 cho thấy protease của chủng này có nhiệt độ tối thích 45°C, pH tối thích là 8 và enzyme này vẫn có khả năng xúc tác ở nhiệt độ và pH cao hơn. Đặc điểm này phù hợp để sử dụng trong sản xuất nước mắm ngắn ngày. Ba chủng 2.2, 2.20, 18.2 được sử dụng để đánh giá khả năng thủy phân cá. Kết quả cho thấy sau 15 ngày lên men, hàm lượng nitơ tổng số của dịch cá có bổ sung dịch nuôi cấy các chủng này cao hơn so với mẫu đối chứng, đặc biệt mẫu bổ sung chủng 2.2 cho kết quả gần gấp đôi so với mẫu đối chứng. Đánh giá cảm quan cũng cho thấy dịch cá cũng trong hơn và ít tanh hơn so với mẫu đối chứng.

Từ khoá: Nước mắm, protease, vi khuẩn ưa muối, vi khuẩn ưa kiềm.

SUMMARY

Halophilic and alkaliphilic bacteria producing protease have potential applications in food industry such as acceleration of fish sauce fermentation. In this study, 449 alkaliphilic strains were isolated from 56 samples collected from coast line, of which 190 strains produced protease. Three strains 2.2, 2.20 and 18.2 exhibit high protease activity, especially strain 2.2 showed highest protease activity and optimally grew in 3-4% NaCl medium. Protease produced by strain 2.2 optimally activated at pH 8, 45°C and 3% NaCl. These properties are useful for accelerating the fermentation process during fish sauce production. Three strains 2.2, 2.20, 18.2 were used to examine their ability to hydrolyze fish. The result showed that after 15 days of hydrolysis, the total nitrogen concentration in fish fluid added with these strains was higher than control samples, especially samples added with strain 2.2 gave a nitrogen content nearly twice as much as controls. Moreover, the fish fluid of samples added starter cultures from these strains was also shown to be more clear and less stinking than controls in sensory research.

Key words: Alkaliphilic bacteria, fish sauce, Halophilic bacteria, protease.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nước mắm, sản phẩm từ cá lên men, được sử dụng rộng rãi ở nhiều nước châu Á, đặc biệt là ở các nước Đông Á và Đông Nam Á như Nhật Bản, Trung Quốc, Thái Lan và Việt Nam (Park & cs., 2001; Sinsuwan & cs., 2008). Nước mắm là sản phẩm giàu dinh dưỡng, có hàm lượng acid amin và acid béo chưa bão hoà cao nên rất có ích đối với sức khỏe con người (Dincer & cs., 2010). Ngoài ra, nghiên cứu gần đây chỉ ra rằng nước mắm còn có hoạt tính chống oxy hoá (Aoshima và Ooshima, 2009). Ở Việt Nam, nước mắm là sản phẩm truyền thống, được sản xuất từ lâu đời. Ngày nay, nước mắm không chỉ được sản xuất để đáp ứng nhu cầu tiêu dùng ở trong nước mà còn được xuất khẩu sang nhiều nước trên thế giới.

Nước mắm sản xuất theo phương pháp lên men truyền thống thường mất nhiều thời gian nên rất khó đáp ứng nhu cầu sử dụng ngày càng lớn trên thị trường. Vì vậy, để đáp ứng nhu cầu sử dụng nước mắm ngày càng tăng cần rút ngắn quá trình lên men cá. Quá trình này có thể rút ngắn bằng cách điều chỉnh pH, nồng độ muối và nhiệt độ. Sự điều chỉnh này với mục đích tối ưu hoá sự sinh enzyme protease của vi khuẩn trong ruột cá (Yongsawatdigul & cs., 2007). Một cách khác để rút ngắn quá trình sản xuất nước mắm là bổ sung vi khuẩn để làm tăng tốc độ lên men. Siringan & cs. (2006) đã bổ sung chính vi sinh vật lên men ở cá để rút ngắn quá trình lên men. Tuy nhiên, hoạt tính của enzyme protease của những vi khuẩn này bị giảm dần trong quá trình lên men do hàm lượng muối cao. Do vậy, sử dụng vi sinh vật chịu mặn sinh protease có thể khắc phục được nhược điểm này.

Kết quả nghiên cứu gần đây cho thấy, sự bổ sung vi khuẩn sinh protease chịu mặn đã rút ngắn quá trình sản xuất nước mắm mà vẫn giữ được chất lượng nước mắm (Yongsawatdigul & cs., 2007; Akolkar & cs., 2010).

Đây là một hướng có thể giúp thúc đẩy ngành công nghiệp sản xuất nước mắm ở nước ta, nơi có bờ biển dài nên nguồn vi sinh vật biển rất phong phú. Đó là nguồn phân lập các vi khuẩn chịu mặn sinh protease có thể ứng dụng trong rút ngắn quá trình sản xuất nước mắm. Nghiên cứu này đã tiến hành phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật sinh protease chịu mặn, chịu kiềm từ các mẫu vùng ven biển và thử nghiệm sử dụng các vi khuẩn này để sản xuất nước mắm ngắn ngày.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Vi sinh vật sinh protease chịu kiềm, chịu mặn được phân lập từ mẫu bùn ven biển, nước biển và mẫu mắm lấy tại Đà Nẵng, Huế, Hội An - Quảng Nam và Thanh Hoá. Các mẫu nước và mẫu bùn biển được lấy tại nhiều điểm khác nhau tại vùng bề mặt nước biển (độ sâu 0,5 - 1 m) bằng các dụng cụ vô trùng, rồi được bảo quản ở 4°C nếu chưa nghiên cứu ngay.

2.2. Phân lập và phân loại vi sinh vật dựa vào hình thái

Hoà tan 1 g mẫu bùn hoặc 1 ml nước bằng 9 ml nước muối sinh lý 0,85%. Dùng máy vortex lắc đều mẫu trong thời gian 10 phút. Sau đó hút 0,5 ml dịch pha loãng trên cho vào 4,5 ml nước muối sinh lý 0,85% được độ pha loãng 10^{-2} . Tiếp tục pha loãng dần như trên đến nồng độ cần thiết.

Lấy 0,1 ml dịch pha loãng ở nồng độ cần thiết nhỏ vào chính giữa các đĩa môi trường vi sinh vật tổng số, môi trường vi sinh vật ưa kiềm, môi trường nấm mốc và môi trường nấm men. Dùng que trang gạt cho đến khi khô mặt thạch. Các đĩa đã gạt đặt trong tủ ấm 37°C. Sau 24 giờ lấy các đĩa ra và đếm số lượng khuẩn lạc.

Các chủng vi sinh vật được phân loại dựa trên hình thái khuẩn lạc và hình thái tế

bào. Các chủng vi sinh vật được phân lập trên môi trường rắn và hình thái khuẩn lạc được quan sát dựa trên các chỉ số: khả năng phát triển, bề mặt khuẩn lạc và màu sắc khuẩn lạc. Hình thái của vi sinh vật được quan sát trên kính hiển vi sau khi được nhuộm Gram (Nguyễn Lâm Dũng & cs., 1972).

2.3. Xác định khả năng sinh tổng hợp một số enzyme

2.3.1. Xác định khả năng thủy phân protein bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch

Phương pháp 1: Thử sơ bộ khả năng thủy phân protein theo phương pháp cấy chấm điểm trên đĩa thạch. Các chủng vi khuẩn được cấy chấm điểm trên môi trường thạch có casein trong hộp petri và ủ ở 30°C trong 24 giờ. Vi khuẩn sinh enzyme protease sẽ thủy phân casein xung quanh khuẩn lạc và xuất hiện vòng thủy phân. Cho thêm trichloroacetic acid (TCA), vòng thủy phân casein có màu trong hơn. Sau đó đo vòng phân giải, so sánh đường kính vòng phân giải của các chủng với nhau để chọn ra chủng có hoạt tính cao.

Phương pháp 2: Vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường lỏng trên máy lắc 200 vòng/phút ở 30°C trong thời gian 24 giờ. Dịch canh trường được thu lại bằng cách ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C để loại bỏ sinh khối. Nhỏ 100 µl dịch enzyme thô vào lỗ thạch có đường kính 5 mm trên đĩa môi trường có chứa casein để xác định vòng phân giải protein. Các đĩa thạch này được để lạnh trong 2 giờ, giúp enzyme có khả năng khuếch tán. Sau đó ủ ở 30°C trong vòng 24 giờ, cho thêm trichloroacetic acid (TCA), rồi quan sát và đo đường kính vòng phân giải (Egorov, 1976).

2.3.2. Xác định khả năng sinh tổng hợp enzyme amylase và cellulase

Vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường lỏng trên máy lắc 200 vòng/phút ở 30°C trong thời gian 48 giờ. Dịch môi trường

được thu lại bằng cách ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C để loại bỏ sinh khối. Nhỏ 100 µl dịch enzyme thô vào lỗ thạch có đường kính 5 mm trên đĩa môi trường có chứa CMC (cacboxyl methyl cellulose) hoặc tinh bột tan. Các đĩa thạch này được để ở 4°C trong 2 giờ, giúp enzyme khuếch tán. Sau đó ủ ở 30°C trong vòng 24 giờ, cho thuốc thử lugol, quan sát và đo đường kính vòng phân giải (Egorov, 1976).

2.3.3. Xác định khả năng sinh tổng hợp chitinase

Vi khuẩn được cấy chấm điểm trên môi trường thạch MPA có bổ sung 1% chitin, Sau 48 giờ và 72 giờ nuôi cấy, đổ dung dịch Congo đỏ (1%) lên bề mặt thạch. Hoạt tính chitinase của vi khuẩn được xác định sơ bộ nhờ đường kính vòng phân giải chitin (Phrommao & cs.) đo được trên đĩa Petri thạch, vòng càng lớn thì hoạt tính enzyme càng cao (Egorov, 1976).

2.4. Phương pháp xác định ảnh hưởng của các yếu tố môi trường đến khả năng sinh tổng hợp protease của vi khuẩn

2.4.1. Ảnh hưởng của nồng độ muối

Các chủng vi khuẩn sau 24 giờ nhân giống trên môi trường nước biển, được cấy chuyển vào môi trường có pH 7 và nồng độ NaCl khác nhau: 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 và 12%, điều kiện nhiệt độ 30°C, lắc ở 200 vòng/phút. Sau 24 giờ nuôi cấy ly tâm dịch nuôi, loại bỏ sinh khối và xác định hoạt tính protease theo phương pháp khuếch tán trên thạch.

2.4.2. Ảnh hưởng của pH

Các chủng vi khuẩn sau 24 giờ nhân giống trên môi trường nước biển, được cấy chuyển vào môi trường có nồng độ NaCl 3% và pH thay đổi từ 3 đến 12, nhiệt độ nuôi cấy là 30°C, lắc ở 200 vòng/phút. Sau 24 giờ nuôi cấy ly tâm dịch nuôi, loại bỏ sinh khối và xác định hoạt tính protease theo phương pháp khuếch tán trên thạch.

2.4.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Các chủng vi khuẩn sau 24 giờ nhân giống trên môi trường nước biển, được cấy chuyển vào môi trường có nồng độ NaCl 3% với pH 7, lắc ở 200 vòng/phút tại các nhiệt độ 25, 30, 37, 45 và 50°C. Sau 24 giờ nuôi cấy xác định khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp protease của các chủng phương pháp khuếch tán trên thạch.

2.5. Xác định một số tính chất của protease từ chủng vi sinh vật tuyển chọn

Vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường lỏng trên máy lắc 200 vòng/phút trong thời gian 24 giờ, nhiệt độ 30°C. Dịch canh trường được ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C để loại bỏ sinh khối. Dịch enzyme thu được dùng để xác định hoạt tính protease bằng phương pháp khuếch tán trên thạch có cơ chất casein ở các pH, nồng độ muối, nhiệt độ khác nhau. Hoạt tính xúc tác của enzyme được đánh giá thông qua đường kính vòng phân giải casein.

2.6. Xác định hoạt độ protease bằng phương pháp Anson cải tiến

Cho 2 ml dung dịch casein 2% pha trong dung dịch đệm vạn năng 0,1 M, pH 8 vào ống nghiệm. Sau đó thêm vào 2 ml dịch nuôi (pha loãng thích hợp) và ủ ở 30°C trong 10 phút. Bổ sung 4 ml TCA 0,3 M và lọc bằng giấy lọc trong 20 phút. Lấy 1 ml dịch lọc vào ống nghiệm, sau đó thêm vào 5 ml Na₂CO₃ 0,5 M và dung dịch 1 ml Folin – Ciocalteau. Trộn đều sau đó ủ ở 30°C trong 20 phút. Đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 670 nm. Ống đối chứng được làm song song bằng cách cho 4 ml TCA 0,3 M vào ống nghiệm trước khi thêm casein và enzyme vào.

Tính kết quả

Hoạt độ protease (Hdp) tính bằng (đv/ml)

$$\text{Hdp} = \frac{(a - b) * 8 * P}{181 * 10 * 1}$$

(a - b): Số microgam tyrosine tương ứng với hiệu số đọc trên máy giữa ống thí nghiệm và ống đối chứng

8: Tổng thể tích của phản ứng enzyme

P: Độ pha loãng của dung dịch enzyme

181: Khối lượng phân tử của tyrosine

10: Thời gian phản ứng enzyme

1: Thể tích enzyme sử dụng trong phản ứng màu.

Hoạt độ protease đặc trưng cho khả năng xúc tác phân giải protein tới peptit và axit amin của các enzyme và được biểu thị bằng số đơn vị protease trên 1 mg protein của chế phẩm.

Một đơn vị hoạt độ protease (Hdp) là lượng enzyme cần thiết xúc tác thủy phân casein để giải phóng 1 umol tyrosin trong 1 phút ở 30°C, pH 8 (Phạm Thị Trân Châu và cs., 1997).

2.7. Phương pháp đánh giá cảm quan chất lượng cá thủy phân

Lắc kỹ bình đựng mẫu thử, rót khoảng 100 – 150 ml dịch cá vào cốc thủy tinh không màu, sạch, khô, dung tích 250 ml để xác định chỉ tiêu cảm quan.

Xác định màu sắc: Khi nhận xét màu sắc phải đặt cốc đựng mẫu thử ở nơi sáng, trên nền trắng, mắt người quan sát phải ở cùng phía nguồn sáng chiếu vào mẫu thử.

Xác định độ trong: Đặt cốc đựng mẫu thử ở giữa nguồn sáng và mắt người quan sát, lắc nhẹ để xác định độ trong.

Xác định mùi: Sau khi rót dịch cá từ bình mẫu vào cốc phải để 5 – 10 phút mới xác định mùi. Cần tiến hành thử ở nơi thoáng, không có mùi lạ để ảnh hưởng tới việc nhận xét mùi của mẫu thử (Lương Hữu Đồng, 1975; Hà Duyên Tư, 1996).

2.8. Xác định hàm lượng nitơ tổng số và nitơ amonia

2.8.1. Xác định hàm lượng nitơ tổng số

Hàm lượng nitơ tổng được xác định theo phương pháp Kjeldhal mô tả bởi Vũ Thị Thư & cs. (2001). 3 ml dịch cá đã pha loãng 20 lần

được vô cơ hoá bằng 5 ml dung dịch H_2SO_4 đậm đặc ở điều kiện nhiệt độ cao. Nitơ amonia tạo thành dưới dạng $(NH_4)_2SO_4$ được chưng cất và thu lại bằng 20 ml dung dịch acid boric 2,5%. Nitơ amonia trong được hấp thu trong dung dịch acid boric được chuẩn độ bằng H_2SO_4 0,1N.

Hàm lượng nitơ tổng số được tính theo công thức sau:

$$NTS = \frac{(V_1 - V_2) \cdot 0,0014 \cdot 20 \cdot 1000}{v}$$

V_1 : Lượng H_2SO_4 0,1N được dùng để chuẩn độ mẫu thí nghiệm (ml)

V_2 : Lượng H_2SO_4 0,1N được dùng để chuẩn độ mẫu đối chứng (ml)

0,0014: Số gam nitơ tương ứng với 1 ml H_2SO_4 0,1N

20: Hệ số pha loãng

1000: Hệ số đổi ra g/l

v: Thể tích dịch cá pha loãng 1/20 lấy để vô cơ hoá (ml).

2.8.2. Xác định hàm lượng nitơ amonia

Hàm lượng nitơ amonia được xác định theo phương pháp Kjeldhal mô tả bởi Vũ Thị Thư & cs. (2001). Hút 3 ml dịch cá đã pha loãng 10 lần cho vào bình cất của bộ cất đậm, sau đó thêm vào 25 ml dung dịch sữa MgO 5%. Tiến hành chưng cất để thu NH_3 bay ra bằng dung dịch acid boric 2,5%. Nitơ amonia trong acid boric được chuẩn độ bằng H_2SO_4 0,1N.

Hàm lượng nitơ amonia được tính theo công thức:

$$NNH_3 = \frac{(V_1 - V_2) \cdot 0,0014 \cdot 10 \cdot 1000}{v}$$

V_1 : Lượng H_2SO_4 0,1N được dùng để chuẩn độ mẫu thí nghiệm (ml)

V_2 : Lượng H_2SO_4 0,1N được dùng để chuẩn độ mẫu đối chứng (ml)

0,0014: Số gam nitơ tương ứng với 1 ml H_2SO_4 0,1N

20: Hệ số pha loãng

1000: Hệ số đổi ra g/l

v: Thể tích dịch cá pha loãng 1/10 lấy để vô cơ hoá (ml).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tuyển chọn chủng vi khuẩn ưa kiềm có hoạt tính sinh học

Trong tổng số 56 mẫu được phân lập để xác định thành phần và các nhóm vi sinh vật, nghiên cứu đã phân lập được 892 chủng vi khuẩn, trong đó có 449 chủng ưa kiềm, chiếm trên 50%. Xác định khả năng sinh tổng hợp enzyme protease, kitinase, cellulase và amylase của các chủng vi khuẩn ưa kiềm này đã cho thấy số vi khuẩn có khả năng sinh protease chiếm trên 42% tổng số vi khuẩn (Bảng 1). Ngoài ra, khả năng sinh các enzyme khác như kitinase, cellulase và amylase cũng thấy ở nhiều chủng vi khuẩn. Trong đó có tới 67 chủng có khả năng sinh cả 4 loại enzyme này, điều đó có thể giúp dễ dàng lựa chọn môi trường nuôi cấy sau này.

Trong số những chủng có khả năng sinh protease này, 23 chủng đã được chọn để tiến hành nghiên cứu sâu hơn. Có 10 chủng trong số các chủng này có khả năng sinh tổng hợp cả 4 loại enzyme protease, kitinase, cellulase và amylase, trong đó có 5 chủng (2.2, 2.20, 9.2, 18.2 và 18.6) có khả năng sinh tổng hợp enzyme protease cao nên được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo (Bảng 2).

Bảng 1. Khả năng sinh một số enzyme của các vi khuẩn ưa kiềm

Hoạt tính enzyme	Tổng số chủng	Protease	Kitinase	Cellulase	Amylase
Số lượng	449	190	290	268	150
Tỷ lệ (%)	100	42,3	64,6	59,7	33,4

Bảng 2. Khả năng sinh một số enzyme của 23 chủng vi khuẩn tuyển chọn

Số TT	Chủng	Protease	Kitinase	Cellulase	Amylase
1	2.17	+	+++	+	-
2	2.19	+	++	+++	+
3	2.2	+++++	+++	+++	+++
4	2.20	+++++	+++	+++	++
5	2.22	+	+++	-	-
6	2.23	+	+	++	+++
7	2.6	++	++	++	++
8	2.7	++	++	++++	++++
9	9.1	++	-	-	+++
10	9.11	+	+	++	++
11	9.2	+++++	++	+	+++
12	9.3	+++	-	++	-
13	9.4	+++	+++	++	+
14	9.5	++	++	++	-
15	9.7	+++	+	+++	-
16	9.8	++	+	-	+
17	18.2	+++++	+++++	+++	++
18	18.3	+	-	-	-
19	18.3	+++	+	+	-
20	18.6	+++++	+++++	+++	++++
21	2.2'	+	++++	+++	++
22	18.3'	+++	++	+++	-
23	18.7'	++	++	+	-

Ghi chú: -: Không có hoạt tính, +: Có hoạt tính yếu. ++ đến ++++: Hoạt tính mạnh tăng dần

Bảng 3. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của các chủng vi khuẩn lựa chọn

TT	Kí hiệu chủng	Màu sắc khuẩn lạc	Hình dáng khuẩn lạc	Kích thước khuẩn lạc (Phrommao & cs.)	Tiết sắc tố	Gram	Hình dạng tế bào
1	9.2	Trắng đục	Mép phẳng, trơn, lồi	2-3	-	(+)	Hình cầu
2	18.2	Trắng đục	Mép răng cưa, nhẵn nheo	4-5	-	(+)	Hình que
3	18.6	Vàng nhạt	Mép phẳng, trơn, tròn	5-6	-	(+)	Hình ovan
4	2.2	Vàng nhạt	Mép phẳng, hơi nhẵn	4-5	-	(+)	Hình que
5	2.20	Vàng nhạt	Mép phẳng, trơn, hơi lồi	3-7	-	(+)	Hình cầu

Ghi chú: -: Không tiết sắc tố; (+): Gram +

3.2. Một số đặc điểm hình thái của 5 chủng vi khuẩn được tuyển chọn

Các chủng vi khuẩn tuyển chọn được cấy lên môi trường nước biển ở 30°C trong 24 giờ, sau đó đem ra quan sát màu sắc, hình dạng và kích thước khuẩn lạc. Khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn này có màu trắng đục hoặc vàng nhạt và hầu hết có mép phẳng, trơn (Bảng 3). Quan sát hình thái vi khuẩn cho thấy cả 5 chủng vi khuẩn đều là Gram (+) nhưng hình dạng rất khác nhau.

3.3. Ảnh hưởng của một số yếu tố đến khả năng sinh trưởng, sinh tổng hợp protease của 5 chủng vi khuẩn tuyển chọn

3.3.1. Ảnh hưởng của nồng độ muối

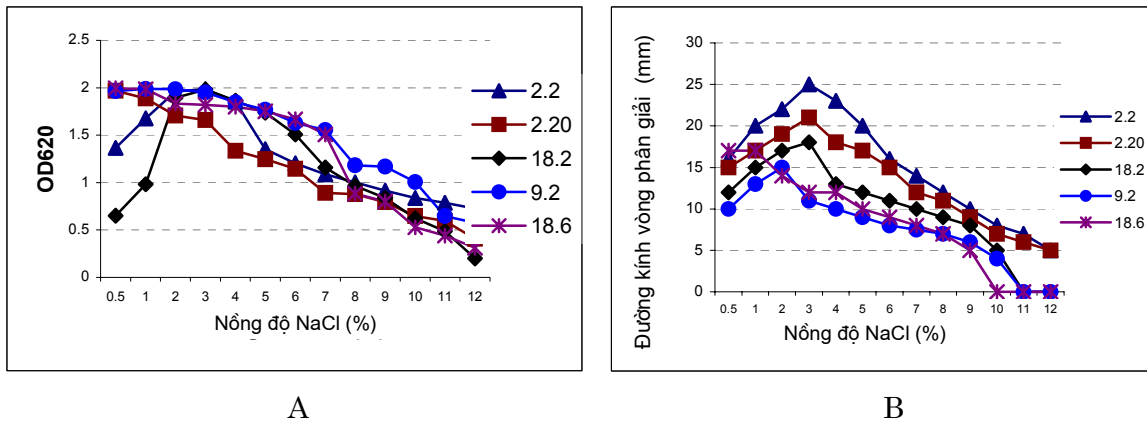
Kết quả cho thấy, nồng độ NaCl ảnh hưởng tới tốc độ sinh trưởng và khả năng sinh tổng hợp protease của cả 5 chủng tuyển chọn. Nhìn chung, tốc độ sinh trưởng và khả năng sinh tổng hợp protease của những vi khuẩn này bị hạn chế ở nồng độ muối quá

cao (Hình 1A, 1B). Các chủng 2.20, 18.6 và 9.2 có khả năng sinh trưởng tốt ở điều kiện nồng độ muối thấp (0,5 - 2%), trong khi đó chủng 2.2 và 18.2 phát triển tốt trong môi trường có nồng độ muối cao hơn, từ 3 - 4%. Khả năng sinh trưởng của cả 5 chủng vi khuẩn này giảm nhanh ở nồng độ muối cao hơn 5%. Ba chủng 2.2, 2.20 và 18.2 có khả năng sinh tổng hợp protease cao hơn 2 chủng còn lại. Khả năng sinh tổng hợp protease của các chủng tỉ lệ với khả năng sinh trưởng của chúng ngoại trừ chủng 2.20 có khả năng sinh trưởng tốt ở nồng độ muối 0,5% nhưng lại sinh tổng hợp protease mạnh trong môi trường có nồng độ muối 3%. Trong số 5 chủng này, chủng 2.2 thể hiện khả năng chịu mặn và sinh tổng hợp protease cao hơn các chủng khác. Đặc tính này rất có lợi để sử

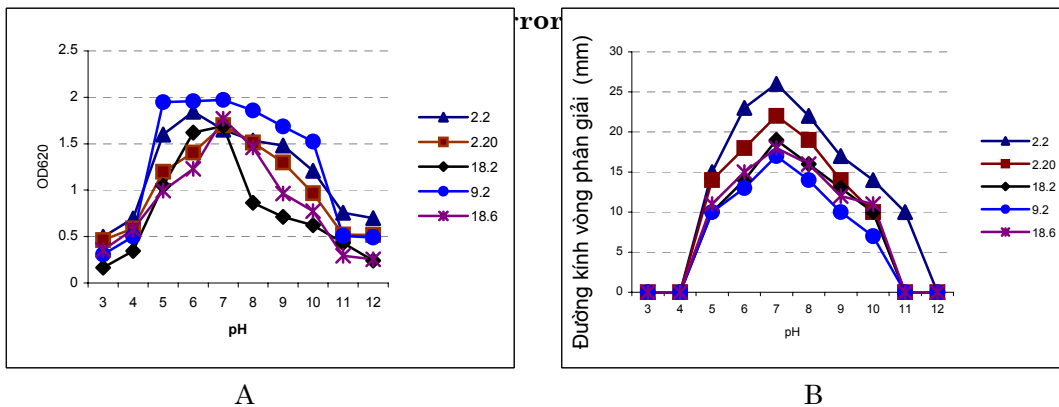
dụng trong công nghệ sản xuất nước mắm ngắn ngày.

3.3.2. Ảnh hưởng của pH ban đầu

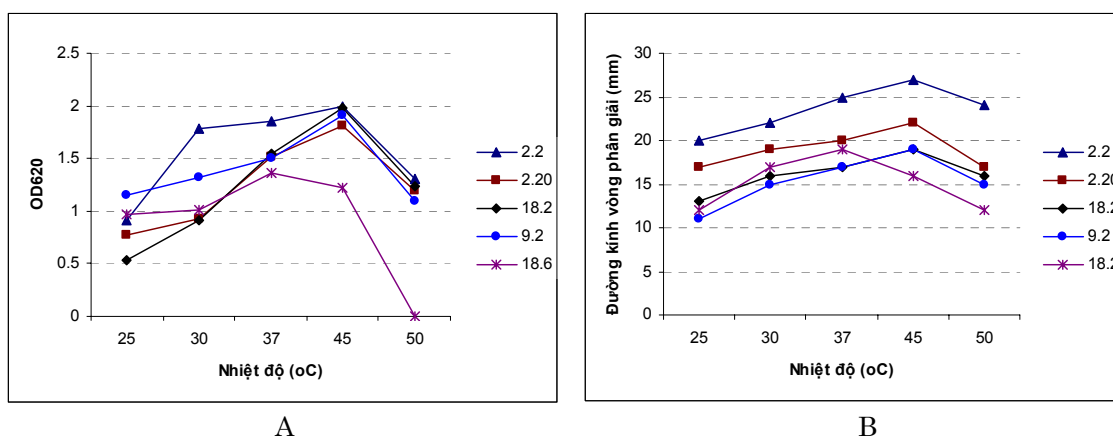
Kết quả chỉ ra cả 5 chủng vi khuẩn sinh trưởng và sinh tổng hợp protease trong vùng pH rộng từ 5 - 10 (Hình 2A, 2B). Tuy nhiên, pH trung tính tối thích nhất cho chúng sinh trưởng và sinh tổng hợp protease. Những nghiên cứu khác cũng cho thấy các chủng vi khuẩn ưa mặn đều có khả năng chịu kiềm tương đối cao và pH cho sinh trưởng, sinh tổng hợp protease tối ưu của chúng thường hơi kiềm (Ventosa & cs., 1998; Vilhelmsson & cs., 1996). Trong số 5 chủng tuyển chọn, hai chủng 2.2 và 9.2 thể hiện khả năng phát triển và sinh protease tốt hơn trong môi trường kiềm.



Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ muối lên khả năng sinh trưởng (A) và sinh tổng hợp protease (B) của 5 chủng tuyển chọn



Hình 2. Ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh trưởng (A) và sinh tổng hợp protease (B) của 5 chủng tuyển chọn



Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh trưởng (A) và sinh tổng hợp protease (B) của 5 chủng tuyển chọn

3.3.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Kết quả hình 3 cho thấy cả 5 chủng đều phát triển tốt ở nhiệt độ từ 30 đến 45°C. Ngoại trừ chủng 18.2 phát triển tốt nhất ở 37°C, bốn chủng còn lại đều phát triển tốt nhất ở nhiệt độ 45°C. Khả năng tổng hợp protease của các chủng này cũng tốt ở điều kiện nhiệt độ 45°C trừ chủng 18.2 thể hiện khả năng sinh tổng hợp protease cao nhất ở 37°C. Như vậy, cả 5 chủng này đều thuộc loại ưa nhiệt. Đây là đặc tính tốt cho ứng dụng sản xuất nước mắm. Đặc biệt chủng 2.2 thể hiện khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp protease cao hơn các chủng khác.

Từ các kết quả trên cho thấy chủng 2.2 là chủng vi khuẩn chịu mặn, chịu kiềm và chịu nhiệt, có hoạt tính protease cao nhất trong 5 chủng đã chọn. Cho nên, chủng 2.2 được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.4. Một số tính chất của enzyme protease của chủng 2.2

Một số tính chất của protease của chủng 2.2 như ảnh hưởng của nồng độ muối, pH và nhiệt độ đến khả năng xúc tác của enzyme đã được nghiên cứu sơ bộ để làm cơ sở bước đầu cho sự phân loại và ứng dụng enzyme trong thực tế. Nhìn chung, cả ba yếu tố nồng

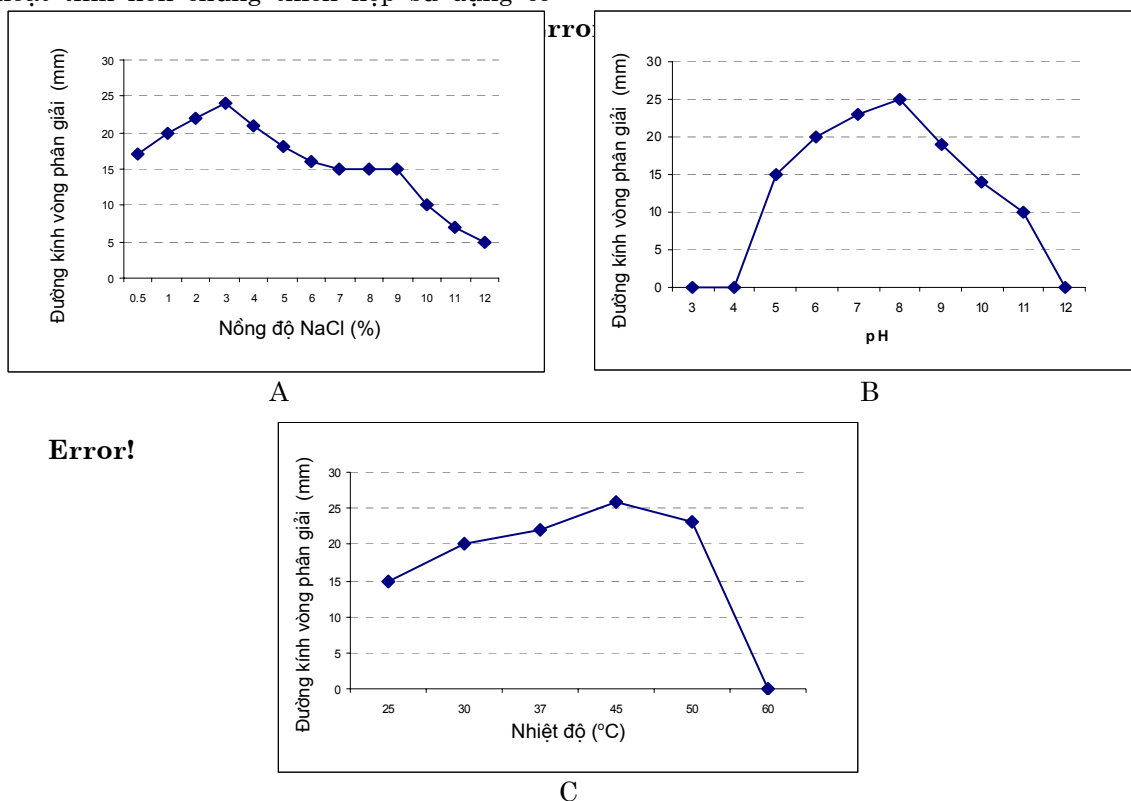
độ muối, pH và nhiệt độ đều ảnh hưởng đến hoạt tính xúc tác của enzyme protease của chủng 2.2 (Hình 4A, 4B và 4C).

Enzyme protease có hoạt tính cao nhất ở nồng độ muối 3% (Hình 4A). Như vậy, nồng độ muối môi trường cho chủng 2.2 phát triển tốt nhất cũng chính là nồng độ muối phản ứng tối ưu cho hoạt động của protease. Ở nồng độ muối từ 6 đến 9%, khả năng xúc tác của enzyme giảm xuống nhưng hoạt tính vẫn khá cao. Hoạt tính xúc tác của enzyme protease giảm mạnh hơn ở nồng độ muối từ 10 đến 12%.

Enzyme protease của chủng 2.2 có khả năng xúc tác trong dải pH rộng (pH 5 - 10) và pH 8 là pH tối thích cho enzyme này (Hình 4B). Tuy nhiên, kết quả này cho thấy giá trị pH 6 thích hợp nhất cho chủng 2.2 phát triển (Hình 2A) và pH 8 là tối ưu cho hoạt động của enzyme protease. Điều này có thể do pH 6 thích hợp cho giai đoạn đầu của quá trình phát triển của vi khuẩn, ở giai đoạn sau, sự phát triển của chủng 2.2 đã làm kiềm hoá môi trường nuôi cấy. Cũng có thể, trong môi trường pH 6 sự phát triển của chủng 2.2 đạt cực đại, khả năng tổng hợp protease và tiết chúng ra ngoài môi trường là tốt nhất nhưng hoạt tính của protease đó lại

cao nhất ở pH 8. Do dải pH hoạt động của protease từ chủng này là khá rộng, ở pH 11 protease từ chủng vẫn còn thể hiện được hoạt tính nên chúng thích hợp sử dụng có

thể hoạt động ở môi trường dịch cá kiềm dần trong quá trình sản xuất nước mắm.



Hình 4. Ảnh hưởng của nồng độ muối (A), pH (B) và nhiệt độ (C) đến hoạt tính xúc tác của enzyme protease từ chủng 2.2

Kết quả cho thấy enzyme protease của chủng 2.2 có khả năng xúc tác trong ở điều kiện nhiệt độ từ 25 đến 50°C, trong đó 45°C là nhiệt độ tối thích của enzyme (Hình 4C). Ở 50°C, hoạt tính xúc tác của enzyme vẫn còn cao, chỉ giảm 12% so với hoạt tính enzyme ở nhiệt độ tối thích 45°C. Enzyme protease hầu như không thể hiện hoạt tính ở nhiệt độ 60°C.

3.5. Động thái sinh trưởng và sinh tổng hợp protease của chủng 2.2

Từ các kết quả trên, nghiên cứu đã lựa chọn được các điều kiện, thông số tối ưu cho sự lên men của chủng 2.2 là nồng độ muối 3%, pH 7, nhiệt độ 45°C. Chủng vi khuẩn này được tiến hành lên men trong môi

trường MPA (pepton 10; cao thịt 5 g/l) với các điều kiện tối thích này để nghiên cứu động thái sinh trưởng và sinh tổng hợp protease.

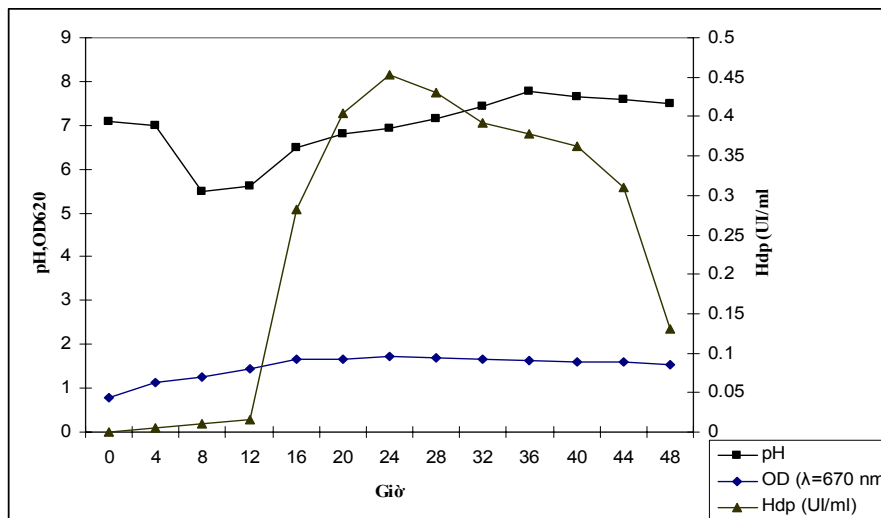
Trong 4 giờ đầu của quá trình lên men có sự tăng nhẹ số lượng vi sinh vật nhưng chưa thấy có sự sinh tổng hợp enzyme. Pha thích nghi không tồn tại có thể lý giải do điều kiện nhân giống và điều kiện lên men tương đồng nhau nên vi khuẩn có thể sinh trưởng ngay. Mật độ tế bào cao nhất sau 24 giờ nuôi cấy (Hình 5).

Sau 16 giờ phát triển, đã xác định thấy hoạt tính của enzyme protease. Sau đó hoạt tính của enzyme tăng dần và đạt cực đại sau 24 giờ. Kể từ thời điểm này hoạt tính xúc tác

của enzyme giảm dần, đặc biệt giảm mạnh sau 48 giờ nuôi cấy.

Môi trường nuôi cấy bị acid hoá sau 8 giờ vi khuẩn phát triển (pH 5,5), sau đó pH

của môi trường tăng lên và được duy trì tương đối ổn định ở pH hơi kiềm trong quá trình lên men.



Hình 5. Động thái quá trình lên men sinh tổng hợp protease của chủng 2.2

3.6. Bước đầu đánh giá khả năng thủy phân cá của chủng vi khuẩn 2.2, 2.20 và 18.2

Nghiên cứu khả năng thủy phân của 3 chủng vi khuẩn 2.2, 2.20 và 18.2 trên hai loại cá phổ biến là cá biển và cá nước ngọt được thực hiện như quy trình đã nêu trên với sự bổ sung dịch nuôi cấy 24 giờ của 3 vi khuẩn lựa chọn theo tỷ lệ 1 ml dịch nuôi cấy/100 g cá. Sau 15 ngày, lấy dịch cá lần đầu để tiến hành đo một số chỉ tiêu cơ bản và đánh giá cảm quan sơ bộ bước đầu (Bảng 4).

Kết quả cho thấy, sau 15 ngày lên men cá đã có sự khác nhau cơ bản giữa mẫu đối chứng với các mẫu có sử dụng dịch nuôi cấy sau 24 giờ của các chủng vi khuẩn đã chọn. Nhìn chung lượng nitơ tổng số của mẫu bổ sung dịch nuôi cấy đều cao hơn so với mẫu đối chứng tuy nhiên lượng nitơ amonia tăng không đáng kể. Akolkar và cs. (2010) cũng báo cáo rằng hàm lượng nitơ tổng số của mẫu có bổ chủng vi khuẩn sinh protease *Halobacterium* sp. SP1 cao hơn mẫu đối

chúng. Kết quả đánh giá cảm quan cho thấy mẫu sử dụng dịch nuôi cấy đã có màu sáng hơn, trong hơn và bắt đầu có hương thơm đặc trưng của mắm. Điều đó chứng tỏ quá trình thủy phân cá đã diễn ra nhanh hơn ở các mẫu có bổ sung dịch nuôi cấy. Nổi bật hơn cả, chủng 2.2 có khả năng thủy phân cá nhanh hơn hai chủng còn lại. Điều này có thể giải thích là do chủng 2.2 có khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp enzyme protease tốt hơn hai chủng đó như kết quả đã thảo luận ở trên. Lượng nitơ tổng số trong dịch cá có bổ sung dịch nuôi cấy của chủng 2.2 đã tăng gần gấp đôi so với mẫu đối chứng nhưng nitơ amonia tăng cao hơn so với mẫu đối chứng (cá nước mặn tăng 42%, cá nước ngọt tăng 10%). Về mặt cảm quan, sau 15 ngày lên men dịch cá có bổ sung chủng 2.2 không những trong nhất, gần với màu đặc trưng của nước mắm nhất mà còn bắt đầu có hương thơm đặc trưng của nước mắm.

Như vậy, khi sử dụng chủng vi khuẩn 2.2 trong thủy phân cá thì hiệu suất thủy phân khá tốt, tuy nhiên lượng nitơ amonia

tạo ra nhiều hơn. Hơn nữa, do thời gian thủy phân ngắn nên các chất tạo nên hương thơm đặc trưng cho nước mắm chưa được tổng hợp nhiều làm giảm độ hấp dẫn cho nước mắm ngắn ngày. Do vậy, để thủy phân cá trong

sản xuất nước mắm ngắn ngày tốt và tạo ra nước mắm có độ hấp dẫn hơn, nên kết hợp chủng 2.2 với các chủng khác có khả năng chuyển hoá nitơ và sinh hương thì hiệu quả thủy phân sẽ cao hơn.

Bảng 4. Chỉ tiêu chất lượng dịch cá lên men sau 15 ngày

Chỉ tiêu	Lên men tự nhiên			Bổ sung chủng nghiên cứu				
	Cá biển	Cá nước ngọt	Cá biển	Cá biển			Cá nước ngọt	
				2.2	2.20	18.2	2.2	2.20
Màu sắc	Đỏ sẫm	Vàng nhạt	Đỏ tươi	Hồng thắm	Hồng tươi	Vàng hơi ánh hồng	Vàng	Vàng hơi sẫm
Mùi	Sốc, tanh	Sốc, tanh	Hơi có hương đặc trưng của nước mắm	Hơi sốc, tanh	Sốc, tanh	Hơi sốc, tanh	Hơi sốc, tanh	Sốc, tanh.
Trạng thái dịch	Rất đục	Đục	Hơi trong	Hơi trong	Đục	Hơi trong	Hơi trong	Đục
Nitơ tổng số (g/l)	9,8	8,4	15,82	13,3	12,32	14,84	11,9	10,92
Nitơ NH ₃ (g/l)	1,61	1,47	2,45	1,47	1,61	1,61	1,61	1,75

4. KẾT LUẬN

Từ 56 mẫu bùn ven biển, nước biển và nước chượp cá lấy tại Đà Nẵng và Thanh Hoá phân lập được 449 chủng vi khuẩn ưa kiềm trong đó có 190 chủng có khả năng phân giải protein.

Đã tuyển chọn được 5 chủng vi khuẩn ưa kiềm, ưa mặn có hoạt tính protease cao là chủng 2.2, 2.20, 18.2, 18.6 và 9.2, trong đó chủng 2.2 có khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp protease mạnh nhất.

Động thái sinh trưởng và sinh tổng hợp protease cho thấy, hoạt tính protease của chủng 2.2 đạt cao nhất sau 24 giờ. Enzyme này hoạt động tối thích ở các điều kiện nồng độ NaCl 3%; pH và nhiệt độ 45°C.

Bước đầu nghiên cứu cho thấy sau 15 ngày thủy phân dịch cá có bổ sung các chủng lựa chọn (2.2, 2.20 và 18.2), cá được thủy phân nhanh hơn so với thủy phân tự nhiên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Akolkar, A. V., D. Durai, and A. J. Desai (2010). *Halobacterium* sp. SP1(1) as a starter culture for accelerating fish sauce fermentation. *Journal of Applied Microbiology* 109(1): 44-53.
- Aoshima, H. and S. Ooshima (2009). Anti-hydrogen peroxide activity of fish and soy sauce. *Food Chemistry* 112(2): 339-343.
- Dincer, T., S. Cakli, B. Kilinc, and S. Tolasa (2010). Amino acids and fatty acid composition content of fish sauce. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 9(2): 311-315.
- Egorov NX (1976). Thực tập vi sinh vật học (Nguyễn Lâm Dũng dịch). NXB. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- Hà Duyên Tư (1996). Quản lý và kiểm tra chất lượng thực phẩm. Trường Đại học Bách khoa Hà Nội.
- Lương Hữu Đồng (1975). Kỹ thuật sản xuất nước mắm. NXB. Khoa học và Kỹ Thuật, Hà Nội.
- Nguyễn Lâm Dũng, Đoàn Xuân Mượu, Nguyễn Phùng Tiến, Đặng Đức Trạch,

- Phạm Văn Ty (1972). Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học, tập 1. NXB. Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.
- Park, J.-N., Y. Fukumoto, E. Fujita, T. Tanaka, T. Washio, S. Otsuka, T. Shimizu, K. Watanabe, and H. Abe (2001). Chemical Composition of Fish Sauces Produced in Southeast and East Asian Countries. *Journal of Food Composition and Analysis* 14(2): 113-125.
- Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Thị Hiền và Phùng Gia Tường (1997). Thực hành Sinh hóa. NXB. Giáo dục.
- Phrommao, E., S. Rodtong, and J. Yongsawatdigul (2011). Identification of novel halotolerant bacillopeptidase F-like proteinases from a moderately halophilic bacterium, *Virgibacillus* sp. SK37. *Journal of Applied Microbiology* 110(1): 191-201.
- Sinsuwan, S., S. Nawong, S. Rodtong, N. Raksakulthai and J. Yongsawatdigul (2008). Characterization of *Virgibacillus* sp. SK33 cell-bound proteinases and its application as a starter culture for fish sauce fermentation. *Journal of Biotechnology* 136 (Supplement 1): S720-S721.
- Siringan, P., N. Raksakulthai and J. Yongsawatdigul (2006). Source and changes of proteinase activities of Indian anchovy (*Stolephorus* spp.) during fish sauce fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86(12): 1970-1976.
- Ventosa, A., J. J. Nieto and A. Oren (1998). Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(2): 504-544.
- Vilhelmsson, O., Hafsteinsson, H. & Kristjánsson, J. K. (1996). Isolation and characterization of moderately halophilic bacteria from fully cured salted cod (bachalao). *Journal of Applied Microbiology* 81(1): 95-103.
- Vũ Thị Thu, Vũ Kim Bảng và Ngô Xuân Mạnh (2001). Giáo trình thực tập hoá sinh. Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội.
- Yongsawatdigul, J., S. Rodtong, and N. Raksakulthai (2007). Acceleration of Thai fish sauce fermentation using proteinases and bacterial starter cultures. *Journal of Food Science* 72(9): 382 - 390.