

## NGHIÊN CỨU VI SINH VẬT ƯA KIỀM VÀ ƯA MẶN SINH PROTEAZA KIỀM TRONG NƯỚC BIỂN CỦA VỊNH BẮC BỘ, VIỆT NAM

LÊ GIA HY, LẠI THANH TÙNG, PHẠM THỊ BÍCH HỢP

*Viện Công nghệ sinh học*

Trên thế giới, việc ứng dụng các chế phẩm enzym trong ngành công nghiệp và chế biến thực phẩm ngày càng phát triển rộng rãi. Trong 10 năm trở lại đây, thị trường này đang tăng lên khoảng 70% mỗi năm [1]; đặc biệt, proteaza được dùng nhiều nhất trong công nghiệp sản xuất chất tẩy rửa, chế biến sữa, sản xuất nước mắm... [3]. Ngoài ra, proteaza còn được sử dụng trong công nghiệp bánh kẹo, phân giải các nguyên liệu protein kém giá trị thành các peptit và các axit amin dễ hấp thụ để làm thức ăn cho động vật [2] và công nghiệp thuộc da và mỹ phẩm. Hơn nữa, việc bổ sung các loại enzym chịu kiềm, chịu mặn vào chất tẩy rửa để sử dụng cho các vùng nước biển là rất cần thiết.

Ngày nay, proteaza không chỉ được sản xuất từ động vật và thực vật mà còn được sản xuất từ vi sinh vật, bởi vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp proteaza cao ngày càng chiếm ưu thế do nguồn cung cấp vô tận, rẻ tiền. Việc nghiên cứu

hệ vi sinh vật biển ở nước ta còn chưa được chú ý nhiều, trong khi diện tích biển của Việt Nam là rất lớn.

Trong bài này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu sự phân bố của vi khuẩn ưa kiềm, chịu mặn từ các vùng biển của Vịnh Bắc Bộ, tuyển chọn chủng có hoạt tính cao để sản xuất proteaza kiềm chịu mặn.

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Vật liệu

Các mẫu nước biển được lấy ở các vùng biển khác nhau thuộc Vịnh Bắc Bộ theo đúng quy trình lấy mẫu nước biển. Phân thu thập các mẫu nước biển được thực hiện bởi Phòng Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Phân viện Hải dương học Hải Phòng. Các mẫu nước biển được ký hiệu như ở bảng 1

*Bảng 1*

**Các mẫu nước biển thu thập từ các vùng biển của Vịnh Bắc Bộ**

Mẫu	Ký hiệu	Địa điểm
1	CT1	Điểm 1-Vịnh Cô Tô-tầng mặt
2	CT3	Điểm 3-Vịnh Cô Tô-tầng mặt
3	CT3*	Điểm 3-Vịnh Cô Tô-tầng đáy
4	MC	Điểm 2-Minh Châu
5	QL1	Quán Lạn 1
6	VC	Vạn Cảnh-Ngọc Vũng
7	VM	Vạn Mỹ-Đông Hưng
8	CL3	Cửa Lò 3
9	SS	Sầm Sơn
10	BL	Bà Lạt
11	CL	Cửa Lục
12	ĐS	Đồ Sơn

*Công trình được hỗ trợ về kinh phí của Chương trình nghiên cứu cơ bản.*

## 2. Môi trường nuôi cấy vi sinh vật

Môi trường nuôi cấy vi sinh vật ưa kiềm AM-1 và AM-2 [2] được thực hiện như sau: các thành phần môi trường được hòa tan vào 1 lít nước, sử dụng  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  để điều chỉnh đến pH = 10 và thanh trùng ở 1 atm kéo dài 45 phút. Sau khi thanh trùng, môi trường đặc được phân vào các hộp petri và ống nghiệm để phân lập và bảo quản giống, còn môi trường lỏng được phân vào các bình tam giác với tỷ lệ 10% thể tích bình để nuôi cấy chìm.

## 3. Phương pháp nghiên cứu

### a. Xác định thành phần và số lượng các nhóm vi sinh vật

Số lượng các nhóm vi sinh vật được xác định theo phương pháp pha loãng tối hạn và nuôi trên môi trường thạch tương ứng với từng loại vi sinh vật.

Số lượng vi sinh vật được tính theo công thức sau:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + n_2 \cdot 10^{-1} + \dots + n_n \cdot 10^{n-1}) d \cdot m} \quad (\text{tế bào/ml})$$

Trong đó:

C: tổng số khuẩn lạc đếm được trên tất cả các hộp petri.

$n_1$ : số khuẩn lạc trong hộp petri ở tỷ lệ pha loãng lần 1.

$n_2$ : số khuẩn lạc trong hộp petri ở tỷ lệ pha loãng lần 2.

$n_n$ : số khuẩn lạc trong hộp petri ở tỷ lệ pha loãng lần n.

d: tỷ lệ pha loãng lần 1.

m: khối lượng mẫu ban đầu (g).

### b. Hình dạng của vi sinh vật

Vi khuẩn được nhuộm gram, còn xạ khuẩn và nấm mốc được quan sát trực tiếp dưới kính hiển vi quang học có độ phóng đại 400-800 lần.

### c. Hoạt tính thủy phân protein

Hoạt tính proteaza sơ bộ được xác định bằng phương pháp cấy các chủng vi sinh vật trên đĩa thạch, sau đó đột các cục thạch có vi

sinh vật phát triển chuyển sang môi trường có casein. Sau khi ủ qua đêm, hiện màu bằng thuốc thử tricloaxetic rồi đo vòng phân giải xung quanh cục thạch.

Hoạt tính proteaza của các chủng ưa kiềm được nuôi trên môi trường lỏng (AM1) trên máy lắc 200 v/p trong 24÷48 giờ, nhiệt độ nuôi cấy: 28÷30°C. Sau đó dịch nuôi được ly tâm 10.000 v/p trong 5 phút để loại bỏ sinh khối. Nhỏ 200µl dịch enzym thô vào lỗ thạch có đường kính 10mm trong hộp petri chứa môi trường có casein. Sau khi ủ ở nhiệt độ 40°C trong 24 giờ, đo vòng phân giải xung quanh lỗ thạch.

### d. Hoạt độ proteaza được xác định theo phương pháp Babakina

Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường lỏng AM-1 trên máy lắc 220 vòng/phút kéo dài 48 đến 72 giờ. Sau khi ly tâm ở 10.000 v/p kéo dài 5 phút để loại bỏ sinh khối, dịch ly tâm được xác định hoạt tính proteaza bằng phương pháp Babakina [10]. Khả năng sinh tổng hợp proteaza của các chủng được đánh giá thông qua hoạt độ proteaza có trong 1 ml dịch enzym thô.

Một đơn vị hoạt độ proteaza (HdP) là 1 lượng enzym có thể thủy phân casein tới mức làm cho khả năng liên kết của nó với HCl giảm một lượng là 1ml HCl 0,1 N sau một giờ xử lý ở nhiệt độ 40°C, độ pH 8,0÷8,2.

Hoạt độ proteaza theo phương pháp Babakina của 1g hoặc 1ml chế phẩm enzym được tính theo công thức sau:

$$HdP = \frac{\Delta a \cdot 50}{10b} \cdot k \quad (\text{đvhđ})$$

Ở đây,  $\Delta a$  là hiệu số đúng của số ml NaOH 0,1N đã dùng chuẩn mẫu thí nghiệm và mẫu đối chứng. Cách tìm: lấy  $a$  (số ml NaOH 0,1 N đã dùng chuẩn mẫu thí nghiệm) trừ đi  $a_k$  (số ml NaOH đã dùng chuẩn mẫu kiểm tra). Hiệu số thu được đem so sánh trong bảng và tìm ra hiệu số đúng.

50: số ml hỗn hợp đem lọc (gồm 20ml casein 5% + 10 ml dịch chiết enzym + 10 ml HCl + 10 ml  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ).

10: số ml nước lọc đã lấy chuẩn độ.

b: lượng chế phẩm enzyme có trong 10ml nước chiết enzyme.

k: hệ số hiệu chỉnh dung dịch kiềm.

Để tính độ hoạt động của 1g chế phẩm enzyme khô tuyệt đối, ta nhân kết quả thu được với tỷ số  $\frac{100}{100 - \varphi}$ . Hệ số hiệu chỉnh dung dịch kiềm  $k = 0,99$  độ ẩm của vật phẩm men  $\varphi = 100\%$ .

## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 1. Thành phần và số lượng vi sinh vật trong nước biển của Vịnh Bắc Bộ

Trong nước, có nhiều loại vi sinh vật: vi

khảo, nấm men, nấm mốc, xạ khuẩn nhưng nhiều nhất vẫn là vi khuẩn. Trong nước biển, mặc dù nồng độ muối khá cao nhưng số lượng vi khuẩn cũng không phải là ít. Có khoảng vài chục đến vài nghìn vi khuẩn trên một mililit nước biển [5].

Trong nước biển, ngoài vi khuẩn ưa mặn, còn có nhiều loại vi khuẩn khác. Thường nước biển chứa trực khuẩn có bào tử (*Bacillus*) và không bào tử (*Bacterium*), ngoài ra còn có cầu khuẩn, niêm vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm men và nấm mốc thì ít hơn [5].

Kết quả phân tích thành phần và số lượng các nhóm vi sinh vật trong nước biển của Vịnh Bắc Bộ (bảng 2) cho thấy sự phân bố của các nhóm vi sinh vật trong nước biển khá phong phú và đa dạng.

Bảng 2

Thành phần và số lượng các nhóm vi sinh vật trong các mẫu nước biển lấy từ các vùng biển của Vịnh Bắc Bộ (CFU/ml)

Mẫu	Ký hiệu	Vi khuẩn hiếu khí	Vi khuẩn kỵ khí	Xạ khuẩn	Nấm mốc	Nấm men
1	CT1	$3.10^3$	$2,5.10$	0	0	$4.10^2$
2	CT3	$5.10^2$	0	0	$2.10^3$	2.10
3	CT3*	5.10	0	$4.10^2$	$4.10^5$	$2,2.10^2$
4	MC	$1.10^2$	0	0	$4.10^3$	0
5	QL1	$1.10^4$	0	0	$2.10^5$	0
6	VC	1.10	$1,6.10$	$4.10^3$	0	0
7	VM	$4.10^5$	$1.10^2$	1.10	1.10	0
8	CL3	$2.10^5$	0	$2.10^2$	0	$2,2.10^2$
9	SS	$4.10^4$	0	$4.10^3$	0	0
10	BL	$2.10^3$	$2.10^2$	$2.10^2$	$4.10^2$	0
11	CL	$4.10^5$	0	0	$4.10^2$	0
12	ĐS	$5.10^5$	$1,5.10$	0	4.10	0

Hầu hết các nhóm vi sinh vật đều xuất hiện; số lượng cao nhất vẫn là vi khuẩn, sau đó đến nấm mốc và xạ khuẩn. Tuy nhiên, nhìn chung, số lượng vi sinh vật tổng số trong các mẫu nước biển thuộc loại trung bình. Đánh giá hàm lượng của các chất hữu cơ có trong các mẫu nước nhìn chung thấp. Chất rắn tổng số có trong các mẫu nước biển từ 0,0113 đến 0,0382 g/l và chất rắn hòa tan từ 0,00308 đến 0,03216 g/l. Do tính đa dạng của vi sinh vật biển, đặc biệt là nhiều loài vi sinh vật biển cho các chất có hoạt tính sinh học quý, nên cần quan tâm nghiên cứu nhiều hơn để bảo vệ tính đa dạng của vi sinh vật biển,

bảo vệ nguồn gen quý hiếm, bảo vệ sinh thái biển. Ở đây, chúng tôi đi sâu nghiên cứu khả năng ưa kiềm, ưa mặn và sinh tổng hợp proteaza của vi khuẩn biển, nhằm tạo chủng sinh proteaza cao để sử dụng trong công nghiệp sản xuất enzyme và bảo vệ môi trường.

### 2. Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn chịu kiềm

Trên môi trường AM-1, chúng tôi đã tuyển chọn được 50 chủng vi khuẩn ưa kiềm. Kết quả nghiên cứu đặc điểm hình thái của các chủng

vi khuẩn ưa kiềm đã tuyển chọn được trình bày ở bảng 3 và kết quả khảo sát khả năng phát

triển của các chủng vi khuẩn này được trình bày ở bảng 4.

Bảng 3

**Đặc điểm hình thái của các chủng vi khuẩn ưa kiềm phân lập được từ vùng biển của Vịnh Bắc Bộ**

Mẫu	Chủng	Đường kính (mm)	Hình dạng	Màu sắc	Độ đồng nhất	Tính tạo sắc tố	Bề mặt
CT1	1	1÷5	Tròn	Trắng	Có	Không	Không bóng, lõi ở giữa, mép phẳng
	2	1÷4	Tròn	Trắng	Có	Không	Không bóng, lõi ở giữa mép xù xì
	3	4÷5	Tròn	Nâu vàng	Có	Không	Phẳng, bóng, mép phẳng
	4	1÷4	Tròn	Vàng chanh	Có	Không	Bóng, lõi ở giữa, mép phẳng
	5	1÷5	Tròn	Trắng trong suốt.	Có	Không	Mép phẳng, lõi ở giữa
	6	3÷4	Tròn	Trắng	Có	Không	Bóng, lõi ở giữa mép phẳng
CT3	1	3	Tròn	Trắng	Có	Không	Bóng, nhẵn, mép phẳng
	2	Dạng điểm	Tròn	Trắng	Có	Không	Mép phẳng, bóng, bề mặt nhẵn
CT3*	1	≈ 2	Tròn	Trắng	Có	Không	Nhẵn, mép phẳng
	2	Dạng điểm	Tròn	Trắng	Có	Không	Bóng, mép phẳng
	3	≈ 2	Tròn	Trắng	Có	Không	Xù xì, mép phẳng
	4	≈ 2	Tròn	Trắng	Có	Không	Nhẵn, mép lượn
CM	1	3÷5	Tròn	Vàng da cam đậm	Không	Không	Bóng, mép phẳng, lõi ở giữa
	2	Dạng điểm	Hình thoi	Da cam nhạt	Có	Không	Phẳng, mép phẳng
	3	1÷9	Tròn	Trắng nhờ	Có	Không	Phẳng, mép xù xì
	4	1÷3	Tròn	Trắng	Có	Không	Bóng, lõi ở giữa, mép phẳng
QL1	1	1÷5	Tròn	Trắng bóng	Có	Không	Bóng, lõi ở giữa, mép phẳng
	2	Dạng điểm	Tròn	Trắng	Có	Không	Phẳng, mép phẳng
	3	2÷5	Tròn	Trắng trong	Có	Không	Khô, lõm ở giữa, mép xù xì
	4	3÷5	Tròn	Trắng đục	Có	Không	Phẳng, mép phẳng
VC	1	3÷5	Tròn	Da cam đậm	Không	Không	Lõm ở giữa, mép phẳng

	2	1	Tròn	Trắng	Có	Không	Lồi cao, bóng, mép phẳng,
	3	< 1	Tròn	Vàng da cam nhạt	Có	Không	Phẳng, mép phẳng
	4	3÷5	Tròn	Trắng đục	Có	Không	Lõm, mép phẳng
VM	1	1÷7	Tròn	Trắng sữa	Có	Không	Bóng, giữa hơi lồi, mép phẳng
	2	3÷7	Tròn	Trắng trong	Có	Không	Bóng, giữa hơi lồi, mép phẳng
CL3	1	8	Tròn	Trắng	Có	Không	Mịn, lồi ở giữa, bột nhão, mép uốn lượn
	2	3	Tròn	Trắng	Có	Không	Mịn, lõm ở giữa, mép phẳng
	3	< 1	Tròn	Trắng	Có	Không	Mịn, mép phẳng
	4	< 5	Tròn	Trắng	Có	Không	Lồi ở giữa, bề mặt xù xì, bột nhão, mép dạng rãnh
	5	< 1	Tròn	Trắng	Có	Không	Bề mặt mịn, mép phẳng
	6	< 5	Tròn	Trắng	Có	Không	Bề mặt mịn, mép phẳng
SS	1	3÷4	Tròn	Trắng	Có	Không	Có rãnh, sợi trắng dài, nhiều nhánh
	2	5÷7	Tròn	Trắng hồng	Có	Không	Bóng, hơi lồi, mép phẳng
	3	2÷5	Tròn	Trắng sữa	Có	Tạo sắc tố màu vàng nâu	Bóng, hơi lồi, mép phẳng.
	4	5	Tròn	Trắng	Có	Không	Bột nhão, lồi, mép phẳng
	5	2÷3	Tròn	Vàng da cam	Có	Không	Bột nhão, lồi, mép phẳng
	6	5÷6	Tròn	Trắng	Có	Tạo sắc tố màu nâu đậm	Bột nhão, hơi lồi, mép xù xì
BL	1	4	Tròn	Mỡ	Có	Không	Bề mặt xù xì, lồi ở giữa, mép uốn lượn
	2	< 1	Tròn	Hồng nhạt	Có	Không	Bề mặt nhẵn mịn, lồi ở giữa, mép phẳng, bóng mờ
	3	2	Tròn	Trắng	Có	Không	Bề mặt mịn, lồi ở giữa, phẳng, bóng
CL	1	1÷5	Tròn	Trắng	Có	Không	Lồi giữa, mép phẳng
	2	2÷5	Tròn	Trắng	Có	Không	Lõm giữa, mép nhẵn nhéo
	3	Dạng điểm	Hình thoi	Da cam nhạt	Có	Không	Phẳng, mép phẳng
	4	3÷5	Tròn	Trắng	Có	Không	Phẳng, mép phẳng

	5	Dạng điểm	Tròn	Trắng	Có	Không	Lồi giữa, mép uốn lượn
ĐS	1	7	Tròn	Màu vàng	Có	Không	Nhấn, lem lồi lõm, mép viền răng cưa, bóng
	2	≈ 7	Tròn	Màu vàng	Có	Không	Nhấn, có lõm ở giữa, mép uốn lượn, bề mặt bóng
	3	7	Tròn	Màu trắng	Có	Không	Bề mặt nhẵn, mép uốn lượn hơi lồi, mặt cắt phẳng dạng màng
	4	≈ 3	Tròn	Trắng	Có	Không	Bề mặt nhẵn, mép phẳng, bóng

Bảng 4

**Khả năng phát triển của các chủng vi khuẩn ưa kiềm đã phân lập được từ các vùng biển của Vịnh Bắc Bộ**

Mẫu	Chủng vi khuẩn	Khả năng phát triển	Mẫu	Chủng vi khuẩn	Khả năng phát triển
CL3	1	++	CT1	1	+++
	2	+-		2	++
	3	+		3	+++
	4	+		4	+
	5	++		5	+
	6	+		6	+
VM	1	++	CT3	1	++
	2	+-		2	++
MC	1	++	CT3*	1	++
	2	+		2	++
	3	++		3	+-
	4	+		4	++
VC	1	++	QL1	1	++
	2	++		2	++
	3	++		3	++
	4	++		4	++
SS	1	+	CL	1	+-
	2	+		2	+
	3	++		3	+-
	4	++		4	+-
	5	++		5	+++
	6	+-	ĐS	1	++
BL	1	++		2	+-
	2	++		3	+++
				4	++

Ghi chú: Phát triển rất tốt: +++; tốt: ++; bình thường: +; yếu: +-.

Các kết quả trình bày ở hai bảng 3 và 4 cho thấy các chủng vi khuẩn ưa kiềm rất đa dạng và phong phú. Trong số 50 chủng nhận được, có 3 chủng phát triển trên môi trường kiềm rất tốt (CT1-3, ĐS-3, CL-5), 27 chủng phát triển tốt, 10 chủng phát triển trung bình và 10 chủng phát triển yếu. Hình thái và màu sắc của khuẩn lạc đa

dạng, phong phú.

### 3. Tuyển chọn các chủng vi khuẩn ưa kiềm sinh proteaza chịu kiềm cao

Kết quả lựa chọn các chủng vi khuẩn đã phân lập được có hoạt tính proteaza trên môi trường có casein được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5

**Khả năng sinh proteaza của các chủng vi khuẩn ưa kiềm đã phân lập được từ các vùng biển của Vịnh Bắc Bộ**

Mẫu	Chủng vi khuẩn	Khả năng sinh proteaza	Mẫu	Chủng vi khuẩn	Khả năng sinh proteaza
		D-d (mm)			D-d (mm)
CL3	1	15	CT1	1	15
	2	-		2	10
	3	10		3	-
	4	16		4	3
	5	17		5	-
	6	14		6	-
VM	1	20	CT3	1	-
	2	-		2	12
MC	1	21	CT3*	1	-
	2	21		2	-
	3	18		3	13
	4	25		4	8
VC	1	9	QL1	1	21
	2	3		2	-
	3	10		3	-
	4	6		4	-
SS	1	-	CL	1	-
	2	15		2	8
	3	9		3	-
	4	20		4	-
	5	9		5	-
	6	17		6	-
BL	1	23	ĐS	1	-
	2	-		2	-
				3	19
				4	-

Kết quả ở bảng 5 cho thấy, trong tổng số 50 chủng vi khuẩn phân lập được, có tới 70% số chủng sinh proteaza. Nhiều chủng có hoạt tính phân giải casein mạnh. Tuy nhiên, theo Knud Aunstrup và Mark M. Zukowski, không phải lúc nào cũng có mối tương quan thuận giữa đường kính của vòng thủy phân protein xung quanh

vi khuẩn lạc trên môi trường thạch với khả năng sinh proteaza của vi sinh vật trong nuôi cấy chìm (hình 1). Để xác định một cách chính xác rằng các chủng vi khuẩn ưa kiềm sinh proteaza kiềm trong điều kiện nuôi cấy chìm, chúng tôi sử dụng bình tam giác có dung tích 250 ml với lượng môi trường đưa vào là 50 ml, lắc trên máy

lắc tròn, tốc độ 200 vòng/phút ở nhiệt độ 28÷30°C trong 48 giờ. Lượng giống đưa vào là

2% theo thể tích dịch lên men. Kết quả được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6

**Khả năng sinh tổng hợp proteaza kiềm của các chủng vi khuẩn ưa kiềm đã phân lập được trong môi trường nuôi cấy chìm**

Chủng	Khả năng sinh proteaza (D-d) mm			Chủng	Khả năng sinh proteaza (D-d) mm		
	16 giờ	36 giờ	48 giờ		16 giờ	36 giờ	48 giờ
CT1-1	2	2	5	CT1-2	0	0	10
CT1-3	0	0	0	CT3-2	0	0	0
CT3*-4	0	5	8	MC-1	0	3	7
MC-3	8	15	20	QL-1	0	10	15
VC-1	0	0	9	VM-1	0	0	0
CL3-1	5	10	10	CL3-4	0	0	0
CL3-5	0	15	15	SS-4	0	10	10
SS-5	0	0	0	SS-6	0	0	10
BL-1	10	15	20	CL-2	0	0	0
ĐS-3	10	15	15				

Qua số liệu tại bảng 6, chúng tôi thu được 8 chủng chịu kiềm và có khả năng sinh tổng hợp proteaza cao: SS-4, SS-6, ĐS-3, BL-1, CL3-1, CL3-5, MC-3 và QL-1.

Vi sinh vật được phân ra làm hai loại: có nguồn gốc biển và không có nguồn gốc biển. Loại có nguồn gốc biển thường có khả năng chịu muối cao. Tuy nhiên, nhiều chủng vi sinh vật không có nguồn gốc biển nhưng vẫn có khả năng thích nghi tốt khi sống trong môi trường biển. Ngoài khả năng chịu muối cao, những chủng này còn có khả năng chịu được nhiệt độ cao, nồng độ O<sub>2</sub> khá thấp và trong một số trường hợp vô cùng ưa kiềm [11].

Dựa vào khả năng chịu muối, Kushner [9] phân loại vi sinh vật như sau: Không ưa mặn, phát triển tốt trong môi trường có nồng độ muối < 0,2 M; ưa mặn không đáng kể, phát triển tốt ở nồng độ muối từ 0,2÷0,5 M; hơi ưa muối (trung bình), phát triển tốt trong môi trường mà nồng độ muối từ 0,5÷2,5 M; ưa mặn, phát triển tốt khi nồng độ muối đạt 1,5÷4 M và cực kỳ ưa mặn, phát triển tốt khi nồng độ muối từ 2,5÷5,2 M (bão hòa).

Để so sánh các chủng đã tuyển chọn được, kết quả nghiên cứu khả năng phát triển, sinh proteaza và chịu mặn của chúng được trình bày ở các bảng 7 và 8.



Hình 1. Vòng phân giải casein của chủng MC-1



Bảng 7

**Khả năng phát triển và sinh proteaza trong môi trường kiềm của các chủng vi khuẩn đã tuyển chọn được**

Chủng	MC-3	QL1-1	CL3-1	CL3-5
Hoạt độ proteaza (đv/ml)	5,346	3,564	4,158	2,673
Độ pH sau lên men	8,450	8,210	7,890	8,070
CFU/ml	$5,3 \cdot 10^{12}$	$7 \cdot 10^{10}$	$1,6 \cdot 10^{12}$	$3 \cdot 10^{12}$
Chủng	SS-4	SS-6	BL-1	ĐS-3
Hoạt độ proteaza (đv/ml)	1,012	1,134	4,752	2,970
Độ pH sau lên men	7,670	7,920	8,16	8,170
CFU/ml	$1 \cdot 10^9$	$3,5 \cdot 10^9$	$4,9 \cdot 10^{11}$	$4 \cdot 10^{12}$

Bảng 8

**Khả năng chịu mặn của các chủng vi khuẩn đã tuyển chọn được**

Chủng	ĐS-3	QL1-1	BL-1	CL3-1	CL3-5	MC-3	SS-4	SS-6
CFU/ml	$7 \cdot 10^4$	10	$15 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^3$	$6 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^4$	0	1

Kết quả trên cho thấy cả 8 chủng đều có khả năng phát triển trên môi trường kiềm tốt, trong đó chủng MC-3 phát triển và cho hoạt tính proteaza kiềm cao nhất; các chủng MC-3 và ĐS-3 chịu mặn tốt nhất; còn 2 chủng SS-4 và SS-6 lại chịu mặn kém. Chủng MC-3 là chủng ưa kiềm, có khả năng chịu mặn tốt nhất và sinh tổng hợp proteaza cao; vì vậy, chủng MC-3 được chọn để nghiên cứu sản xuất proteaza chịu kiềm, chịu mặn.



**Hình 2.** Hình dạng tế bào của chủng vi khuẩn MC-3 (x15.000)

### III. KẾT LUẬN

1. Kết quả nghiên cứu thành phần và số lượng các nhóm vi sinh vật trong nước biển của Vịnh Bắc Bộ cho thấy hầu hết các mẫu nước biển đều có vi khuẩn hiếu khí từ  $10$  đến  $4 \cdot 10^5$  CFU/ml; vi khuẩn kỵ khí, xạ khuẩn và nấm mốc ít hơn và ít nhất là nấm men.

2. Kết quả nghiên cứu vi khuẩn ưa kiềm cho thấy số lượng cũng như hình thái và màu sắc của các chủng ưa kiềm đa dạng và phong phú. Trong số 50 chủng vi khuẩn nhận được, có 3 chủng phát triển rất tốt trên môi trường kiềm, 27 chủng phát triển tốt, 10 chủng phát triển trung bình và 10 chủng phát triển yếu.

3. Đã tuyển chọn được 8 chủng vi khuẩn (SS-4, SS-6, ĐS-3, BL-1, CL3-1, CL3-5, MC-3 và QL-1) ưa kiềm (pH = 10) và ưa mặn (NaCl = 20%). Chủng vi khuẩn MC-3 có khả năng sinh tổng hợp proteaza kiềm cao nhất.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Mulion J. L.**, 1994: Enzymes en agroalimentaire, Tech. et Doc. Lavoisier, Paris.

2. **Horikishi K.** and **T. Akiba**, 1982: Alkalophilic microorganisms, A new microbial world, Japan Scientific Society Press. Tokyo.
3. **Lê Ngọc Tú và cs.**, 1982: Enzym vi sinh vật. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
4. **Lương Đức Phẩm**, 2000: Vi sinh vật và an toàn vệ sinh thực phẩm. Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội.
5. **Volcani B. E.**, 1944: The microorganisms of Dead Sea. Daniel Sieff Research Institute, Israel.
6. **Moshe Shilo**, 1978: Strategies of microbial life in Extreme Environments. Report of Dahlem Workshop on Strategy of Life in Extreme environments. Berlin.
7. **Mullakhanbhai M. F.** and **Larsen H.**, 1975: *Halobacterium volcani spec. nov.*, A Dead Sea *Halobacterium* with moderate salt requirement. Arch. Microbiol.
8. **Kushner D. J.**, 1985: The Halobacteriaceae, Vol 8. Academic Press, London.
9. **Egorov N. X.**, 1983: Travaux pratiques de microbiologie. Edition des Sciences et Techniques.
10. **Colwell R. R.** and **R. Y. Morita**, 1972: Effect of the ocean environment on microbial activities. University Park Press, Baltimore, Maryland.
11. **Bernfeld P.**, 1955: Methods in Enzymology, 4(1): 149-158.
12. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 1989: Vol. 4.

## STUDY ON ALKALOPHILIC AND HALOPHILIC MICROORGANISMS IN THE SEA WATERS OF NORTHERN VIETNAM GULF

LE GIA HY, LAI THANH TUNG, PHAM THI BICH HOP

### SUMMARY

The use of enzymes in industry and food process has been extended rapidly. Proteases are used in many industrial applications, such as detergent production, milk processing, fish sauce production etc. Especially, the alkaline and saline-stable enzymes as complement into detergents for sea and brackish-water areas are of great interest. Therefore, studies on the distribution of alkalophilic and halophilic bacteria in the sea and coastal areas, screening of the desired strains and optimization of the enzyme production conditions are necessary.

The results of this study showed that samples collected from the Northern Vietnam gulf and coastal areas contained mainly aerobic bacteria at the concentrations up to  $4.10^5$  CFU/ml. Other groups, including anaerobic bacteria, actinomycetes and fungi were present at lower concentrations. Yeasts were found with the lowest count. The morphological and physiological characteristics of the isolates have been studied and the results indicated to the great diversity of our marine microflora. Fifty bacteria were tested for the ability to grow in alkaline media, where 3 strains grew very well and other 27 strains grew well. The rest showed poor to normal growth. Eight bacteria (SS-4, SS-6, DS-3, BL-1, CL3-1, CL3-5, MC-3 and QL-1) were topped for the tolerance of alkaline (pH = 10) and saline conditions (NaCl 20%). Of them, the strain MC-3 was selected for further study on the production of alkaline protease.

*Ngày nhận bài: 24-4-2003*