



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN  
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)  
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



**2-0002670**

(51) **C12N 1/20**  
2020.01

(13) **Y**

---

(21) 2-2021-00103

(22) 04/03/2019

(67) 1-2019-01079

(45) 25/07/2021 400

(43) 27/05/2019 374A

(73) Trường Đại học Bách khoa Hà Nội (VN)

Số 1, Đại Cồ Việt, Hai Bà Trưng, Hà Nội

(72) Lê Thanh Hà (VN); Nguyễn Thị Minh Tú (VN); Nguyễn Tiến Thành (VN).

---

(54) CHŨNG VI KHUẨN LACTIC CHỊU MẶN TETRAGENOCOCCUS HALOPHILUS V7-3

(57) Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn lactic chịu mặn *Tetragenococcus halophilus* V7-3 có khả năng sinh trưởng tốt trên môi trường khoáng có giá thành thấp hơn thay thế cho MRS. Khi lên men dịch thủy phân protein cá bởi proteaza, chủng *Tetragenococcus halophilus* V7-3 có khả năng tạo hương vị đặc trưng nước mắm chỉ sau 6 tháng lên men. Nước mắm thu sau 6 tháng lên men bởi *Tetragenococcus halophilus* V7-3 được có hàm lượng nitơ tổng là 21 g/L, hàm lượng nitơ amin chiếm 55%, hàm lượng đạm thối chỉ chiếm 15% so với nitơ tổng. Hàm lượng các axit amin tự do chiếm 593 mg/L trong đó hàm lượng các axit amin không thay thế isoleucin và tyrosin tăng từ 2-4 lần so với các chủng khác đạt 130mg/L và 160 mg/L. Chủng này có trình tự vùng 16s rADN là 1439 bp.

### Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học thực phẩm. Cụ thể, sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn lactic chịu mặn *Tetragenococcus halophilus* V7-3 thu nhận tại nước mắm Cửa Hội, Nghệ An, Việt Nam và khảo sát khả năng sinh aminopeptidaza và sinh các hợp chất hương.

### Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Nhìn chung, chế biến nước mắm theo phương pháp cổ truyền ở nước ta còn thô sơ và thời gian chế biến còn dài (khoảng 12 tháng) đem lại hiệu quả kinh tế còn thấp. Chính vì vậy, nhiều công trình nghiên cứu trong và ngoài nước hướng tới việc tăng cường quá trình thủy phân và rút ngắn thời gian sản xuất.

Do vậy, các nghiên cứu đã sử dụng proteaza có sẵn trong cá hoặc thêm proteaza từ bên ngoài vào. Tuy nhiên nếu sử dụng hệ proteaza sẵn có thời gian lên men vẫn dài. Còn các sản phẩm nước mắm ngăn ngày dùng proteaza bên ngoài có giá trị cảm quan thấp, hương vị kém. Do vậy một trong các hướng đi hiện nay là kết hợp bổ sung thêm các vi sinh vật sinh hương trong nước mắm vào dịch thủy phân cá bằng proteaza.

Hệ vi sinh vật sinh hương được sử dụng ở Việt nam hiện nay bao gồm *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Lactococcus* và *Staphylococcus*. Tuy nhiên các chủng sử dụng đều là các chủng chịu mặn vừa phải khoảng 10% muối nên khó có khả năng tồn tại, sinh proteinaza và sinh hương trong dịch lên men 25% muối.

Hệ vi sinh vật chịu mặn sinh proteinaza và sinh hương đã được nghiên cứu sử dụng ở Thái Lan như *Tetragenococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Virgibacillus* sp. và *Halobacterium* sp.. Trong số các loại vi sinh vật đó, *Tetragenococcus halophilus* được đánh giá có tiềm năng. Thái Lan là nước đầu tiên sử dụng *Tetragenococcus halophilus* MRC 10-1-3 và *Tetragenococcus halophilus* MCD 10-5-10 làm chủng khởi động cho lên men nước mắm. Kết quả cho thấy *Tetragenococcus halophilus* MRC 10-1-3 và *T. halophilus* MCD 10-5-10 có thể tạo ra các hợp chất bay hơi 2-methylpropanal, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, và benzaldehyt, cải thiện thành phần axit amin làm tăng hàm lượng hầu hết các axit amin từ 2-14% trừ 2 axit amin là serin và argin. Các

chủng *T. halophilus* rất đa dạng và có đặc tính phong phú. Trong khi chưa có một nghiên cứu nào phân lập *Tetragenococcus* sp. cũng như xác định đặc tính của chúng ở Việt Nam nói chung và ứng dụng trong nước mắm nói riêng.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Mục đích của sáng chế là khắc phục được những điểm nêu trên. Để đạt được mục đích đó, sáng chế đề xuất chủng *Tetragenococcus halophilus* V7-3 có khả năng sinh trưởng tốt trên một trường khoáng có giá thành rẻ hơn so với môi trường MRS mà không làm giảm lượng sinh khối thu được và có khả năng sinh proteaza, lipaza, aminopeptidaza và sinh các hợp chất bay hơi. Cụ thể, sáng chế đề cập đến chủng *Tetragenococcus halophilus* V7-3 phân lập từ nước mắm Cửa Hội ở Nghệ An, Việt Nam có khả năng sinh tổng hợp enzym aminopeptidaza thủy phân protein thành các axit amin và sinh các hợp chất bay hơi. Hoạt tính aminopeptidaza của *T. halophilus* V7-3 mạnh đối với Glu-pNA. Axit amin glutamic đóng vai trò quan trọng cho tạo vị umami. Hàm lượng 2 axit amin isoleucin và tyrosin cao hơn các chủng khác từ 2 đến 4 lần. Hai axit amin này là các axit amin không thay thế. Các hợp chất bay hơi của V7-3 xác định được sau 6 tháng lên men bao gồm nHexan, 3,3-dimetyl-; hHexan, 2,4-dimetyl-; axit pentanoic; phenol; axit oxalic, este hexyl neopentyl; axit oxalic, este isohexyl neopentyl; axit sunfuric, este hexyl octyl; 1-hexanol,4-metyl-; axit formic, octyl ester; axit formic, este decyl; benzyl 2-chloetyl sulfon; 1-hexanol; cyclobutaneetanol,b-metylen-; 1,2,3-trimetyldiaziridin; 2-heptanon, 6-metyl-; axit pentanoic, este etyleste 2,2,2-trifloetyl; phenol, 3,5-dimethoxy-; axit dicloaxetic,4-hexaeste decyl; axit terephthalic, este di(2-methoxyetyl). Việc phân lập và xác định chủng do Phòng Thí nghiệm Bộ môn Công nghệ sinh học - Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội, Việt Nam tiến hành. Chủng vi khuẩn này có trình tự 16s rADN đã được xác định với tên phân loại là *Tetragenococcus halophilus* V7-3.

### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Hình 1 là ảnh chụp khuẩn lạc của *Tetragenococcus halophilus* V7-3.

Hình 2 là trình tự vùng 16s rADN của chủng *Tetragenococcus halophilus* V7-3.

Hình 3 là ảnh chụp tế bào *Tetragenococcus halophilus* V7-3 .

### Mô tả chi tiết sáng chế

Trong phạm vi của sáng chế, chủng vi khuẩn lactic chịu mặn *T. halophilus* V7-3 sẽ được bộc lộ rõ ràng ở đây thông qua các phương án thực hiện sáng chế.

Sáng chế đề cập đến chủng lactic chịu mặn *T. halophilus* V7-3 có khả năng ứng dụng làm chủng khởi động cho dịch thủy phân protein cá bằng Alcalaza và Flavourzym, chỉ trong 6 tháng đã thu được nước mắm có hương vị tương tự nước mắm lên men truyền thống. Chủng *Tetragenococcus halophilus* V7-3 được phân lập từ chượp mắm Cửa Hội, Nghệ An, được mô tả và định danh bởi Phòng Thí nghiệm Bộ môn Công nghệ sinh học - Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội, Việt Nam. Chủng vi khuẩn này có trình tự vùng 16s rADN được nêu trong SEQ ID NO:1 và được phân loại là *Tetragenococcus halophilus* V7-3. Hiện chủng vi khuẩn này được lưu giữ ở dạng thuần khiết về mặt sinh học tại Phòng Thí nghiệm Bộ môn Công nghệ sinh học - Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội, Việt Nam.

Chủng *Tetragenococcus halophilus* V7-3 được phân lập như sau: Pha loãng mẫu chượp nước mắm ở các mức khác nhau, lấy 100µl mẫu đã pha loãng cho vào đĩa thạch, trải đều trên môi trường MRS bổ sung CaCO<sub>3</sub> 0,5% và NaCl 5% đến khi mặt thạch khô. Nuôi trong điều kiện yếm khí ở 30°C trong 3-5 ngày. Sau đó tiếp tục cấy ria khuẩn lạc trên những đĩa thạch có thành phần môi trường tương tự, cấy ria cho đến khi các khuẩn lạc tách ra riêng rẽ. Sau đó, cấy ria tinh sạch trên các đĩa thạch tới khi thu được chủng thuần.

Chủng vi khuẩn được tách và đánh số và kiểm tra khả năng sinh trưởng và sinh proteaza trên môi trường MRS 18% NaCl, môi trường nước luộc cá có chứa 25% NaCl, khả năng sinh aminopeptidaza và khả năng sinh các hợp chất bay hơi tạo hương vị, phân tích hàm lượng axit amin và hợp chất bay hơi trên dịch thủy phân cá bởi proteaza được lên men 6 tháng. Chủng V7-3 thu nhận từ chượp mắm Cửa Hội, Nghệ An được đánh số 7-3, bước đầu sinh tổng hợp aminopeptidaza nội bào với hoạt độ 1,64 U/mL và 1,42 U/mL đối với cơ chất Glu-pNA và Leu-pNA, sinh trưởng nhanh và mạnh trên môi trường MRS 18% NaCl, được chọn phân loại dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự vùng 16s rADN dựa trên cặp mồi xuôi 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') và mồi ngược 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3') theo chu trình nhiệt: 95°C trong 5 phút,

30 chu trình (95°C trong 45 giây, 56°C trong 60 giây, 72°C trong 90 giây), 72°C trong 5 phút, giữ mẫu ở 4°C. Tác giả tiến hành, nghiên cứu đặc điểm hình thái về khuẩn lạc, tế bào và đặc tính hóa sinh của *Tetragenococcus halophilus* V7-3 cũng như nghiên cứu động học quá trình lên men của chủng trên môi trường dịch thủy phân cá. Đồng thời tác giả đã nghiên cứu tìm môi trường tăng sinh thay thế môi trường MRS có giá thành giảm 50%.

Để định danh chủng *Tetragenococcus halophilus* V7-3 theo sáng chế, tiến hành giải trình tự với cặp môi sử dụng bao gồm:

Môi xuôi: 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3')

Môi ngược: 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3')

Kết quả giải trình tự thu được trình tự kích thước là 1439bp như được thể hiện trong SEQ ID NO: 1, kết quả này được dùng để định danh bằng cách sử dụng chương trình BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) để so sánh các đoạn gen 16S rARN trên ngân hàng gen. Kết quả cho thấy chủng *Tetragenococcus halophilus* V7-3 theo sáng chế thuộc chi *Tetragenococcus* và thuộc loài *halophilus*, và đây được xác định là một chủng mới.

Trên môi trường MRS, ở nhiệt độ 30°C, khuẩn lạc chủng *Tetragenococcus halophilus* V7-3 nhỏ có đường kính 1-2mm, màu trắng sữa bóng, hình tròn, lồi thấp, và mịn (Hình 1). Chủng phát triển trong dải nhiệt độ từ 20 - 40°C, phát triển tốt nhất ở nhiệt độ 35°C, độ pH sinh trưởng từ 4 - 9, tốt nhất ở 6,5 - 7,5, chịu được nồng độ muối đến 25% và có khả năng sinh trưởng trong điều kiện không có muối, phát triển tốt nhất ở nồng độ muối 5-6,5%. Theo sáng chế, chủng *Tetragenococcus halophilus* V7-3 được tăng sinh trên môi trường khoáng với thành phần như sau cao nấm men 2%, CH<sub>3</sub>COONa 1%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5%, Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> 1%, Tween 80 0,1%, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,02%, MnSO<sub>4</sub>.4 H<sub>2</sub>O 0,002%, glucoza 2%. So với môi trường MRS thì môi trường này có giá thành rẻ hơn. Theo sáng chế chủng *Tetragenococcus halophilus* V7-3 khác biệt ở chỗ, là chủng vi khuẩn có khả năng sinh trưởng nhanh trên nguyên liệu dịch thủy phân cá sau 6 tháng có hương vị nước mắm đặc trưng nước mắm truyền thống, có chứa hàm lượng axit amin cao, đặc biệt các axit amin không thay thế isoleucin và tyrosin. Nước mắm sau 6 tháng lên men có chứa các hợp chất bay hơi như axit

pentanoic, este 2-propenyl; axit pentanoic, 2,2,4-trimetyl-3-hydroxy-, este isobutyl; axit butanoic, 2,4-dibromo-, este etyl; 3-hexanol; phenol, 2-methoxy-4-(1-propenyl)-; 2-heptanon, 4,6-dimetyl-; axit sunfuric, este isohexyl pentyl; benzyl 2-cloetyl sulfon. Nước mắm sau lên men 6 tháng bởi *Tetragenococcus halophilus* V7-3 có chứa hàm lượng nitơ amin chiếm hơn 55% so với nitơ tổng trong khi hàm lượng đạm thối chỉ chiếm 15% so với nitơ tổng.

### Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây chỉ nhằm minh họa các phương án thực hiện sáng chế mà không làm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Ví dụ 1: Mẫu chượp cá lên men tháng thứ 7 tại Cửa Hội, Nghệ An, Việt Nam được lấy 200g vào lọ nhựa và được gửi ngay về phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học, Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội. Pha loãng thập phân mẫu chượp nước mắm bằng NaCl 0,9 % ở các độ pha loãng  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ . Lấy 100 $\mu$ l mẫu đã pha loãng cho vào đĩa thạch, trải đều trên môi trường MRS bổ sung  $\text{CaCO}_3$  0,5% và NaCl 5% đến khi mặt thạch khô. Nuôi trong điều kiện yếm khí ở 30°C trong 3-5 ngày. Sau đó tiếp tục cấy ria khuẩn lạc trên những đĩa thạch có thành phần môi trường tương tự, cấy ria cho đến khi các khuẩn lạc tách ra riêng rẽ. Sau đó cấy ria tinh sạch trên các đĩa thạch tới khi thu được chủng thuần.

+ Kiểm tra đặc tính sinh học

Chủng *Tetragenococcus halophilus* V7-3 được nuôi cấy yếm khí trên môi trường MRS chứa 5% NaCl và 0,5%  $\text{CaCO}_3$ . Trên môi trường MRS, ở nhiệt độ 30°C, khuẩn lạc chủng *Tetragenococcus halophilus* V7-3 nhỏ có đường kính 1-2mm, màu trắng sữa bóng, hình tròn, lồi thấp, và mịn. Tế bào chủng bắt màu gram dương, dạng cầu khuẩn, thường cặp đôi hoặc bốn, kích thước tế bào từ 0,5-0,8  $\mu$ m. Chủng phát triển trong dải nhiệt độ từ 20 - 40°C, phát triển tốt nhất ở nhiệt độ 35°C, độ pH sinh trưởng từ 4 - 9, tốt nhất ở 6,5 - 7,5, chịu được nồng độ muối đến 25% và có khả năng sinh trưởng trong điều kiện không có muối, phát triển tốt nhất ở nồng độ muối 5 - 6,5%. So với các chủng *Tetragenococcus halophilus* khác chủng *Tetragenococcus halophilus* V7-3 có khả năng sinh trưởng nhanh trên môi trường MRS 18% NaCl và nước lợc cá chứa 25% NaCl. Chủng *Tetragenococcus halophilus* V7-3 chỉ có khả năng sử dụng D-

fructoza and D-melibioza trong 50 loại đường của kit API, ít hơn nhiều so với các chủng *Tetragenococcus halophilus* khác thể hiện sự khác biệt của chúng.

+ Xác định trình tự gen 16s rADN chủng *Tetragenococcus halophilus* V7-3

ADN tổng số vi khuẩn được tách chiết như sau: khuẩn lạc được hoạt hóa trong môi trường LB ở 30°C, tốc độ lắc 150rpm trong 24 giờ. Ly tâm dịch nuôi vi khuẩn ở 5000xG trong 10 phút ở 4°C, lấy sinh khối tế bào để tách chiết ADN. Hòa tan sinh khối tế bào trong 0,5ml đệm (Tris-HCl, EDTA, NaCl, SDS). Ủ phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, siêu âm 70% năng lượng 5 phút on/ 5 phút off. Bổ sung lysozym 20µg/ml, ủ ở nhiệt độ 37°C, trong 1 giờ. Bổ sung 0,15 ml CH3COOK, ly tâm 1000xG, thu dịch trong. Tủa ADN bằng isopropanol tỉ lệ 1:1, ly tâm ở 13000G trong 10 phút ở 4°C thu tủa. Rửa tủa bằng EtOH 70%. Làm khô tủa và hòa tại lại ADN với 50µg H<sub>2</sub>O deion đã thanh trùng sau đó ủ ở 65°C, trong 5 phút. Sau đó tiến hành kiểm tra các sản phẩm của PCR bằng điện di trên gel agarosa 1%. Sử dụng cặp mồi đặc hiệu 27F/1492R với trình tự: cặp mồi xuôi 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') và mồi ngược 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3') theo chu trình nhiệt: 95°C trong 5 phút, 30 chu trình (95°C trong 45 giây, 56°C trong 60 giây, 72°C trong 90 giây), 72°C trong 5 phút, giữ mẫu ở 4°C. Trình tự vùng 16s rADN của chủng *Tetragenococcus halophilus* V7-3 được thể hiện trên Hình 2 và SEQ ID NO: 1.

Ví dụ 2: Xác định hoạt tính aminopeptidaza và khả năng sinh hợp chất bay hơi của *Tetragenococcus halophilus* V7-3

Chủng *Tetragenococcus halophilus* V7-3 được nuôi cấy trong môi trường MRS chứa 10% NaCl và được ủ ở 30°C trong 5 ngày trong điều kiện yếm khí. Các tế bào được thu bằng cách ly tâm ở 10.000 × G trong 15 phút ở 4°C. Sau đó, 250µl lysozym 5mg/ml được thêm vào các tế bào và được ủ ở 37°C trong 1 giờ. Sau đó, các tế bào được rửa hai lần với dung dịch đệm 0,2M (độ pH 7,5) và được hòa tan lại trong 2ml dung dịch đệm tương tự. Các tế bào đã bị phá vỡ bằng cách sử dụng siêu âm trong 2 phút. Xác tế bào được loại bỏ bằng cách ly tâm ở 10.000 × G trong 15 phút ở 4°C. Dịch nổi được sử dụng để xác định hoạt tính aminopeptidaza nội bào bằng cách sử dụng các dẫn xuất amino p-nitroanilide là Glu-pNA và Leu-pNA. Chủng

*Tetragenococcus halophilus* V7-3 có hoạt tính aminopeptidaza nội bào với hoạt độ 1,64U/mL và 1,42U/mL đối với cơ chất Glu-pNA và Leu-pNA.

Để xác định các hợp chất bay hơi, chủng *Tetragenococcus halophilus* V7-3 thuần khiết được cấy vào 50ml nước lợc cá chứa 25% NaCl và được ủ ở 30°C trong 14 ngày trong điều kiện yếm khí. Sau 14 ngày, phần nổi phía trên được thu bằng cách ly tâm ở  $10.000 \times G$  trong 10 phút ở 4°C. Các hợp chất dễ bay hơi thu được bằng cách chưng cất hơi nước sau đó là chiết bằng diclometan. Sau đó, phân tích các chất bay hơi bằng máy sắc ký HP 6890N Plus của Agilent Technologies được gắn với cột mao quản silica HP-5 MS (30 mx 0,25mm, độ dày màng 0,25 5m) và kết nối với máy quang phổ khối HP 5973 MSD được sử dụng cho phân tích GC/MS. Các điều kiện phân tích là: khí mang He (2mL/phút), nhiệt độ kim phun (PTV) 250°C, nhiệt độ đầu dò 260°C, nhiệt độ cột được lập trình 60°C (giữ 2 phút) đến 220°C (giữ 10 phút) ở 4°C/phút. Các điều kiện MS như sau: điện áp ion hóa 70eV; dòng phát xạ 40mA; có thể quét phạm vi khối lượng từ 35 - 350amu với tốc độ lấy mẫu là 1,0 lần quét/s. Trên môi trường nước lợc cá sau 14 ngày chủng *Tetragenococcus halophilus* V7-3 sinh các hợp chất bay hơi phân tích được như axit pentanoic, 2-propenyl ester; axit pentanoic, 2,2,4-trimethyl-3-hydroxy-, este isobutyl; axit butanoic, 2,4-dibromo-, este ethyl; 3-hexanol; phenol, 2-methoxy-4-(1-propenyl)-; 2-heptanon, 4,6-dimethyl-; axit sunfuric, este isohexyl pentyl; benzyl 2-chloroethyl sulfon.

Ví dụ 3: Tìm môi trường tăng sinh cho *Tetragenococcus halophilus* V7-3

Chủng *Tetragenococcus halophilus* V7-3 được nuôi cấy trên môi trường MRS chuẩn chứa 5% NaCl và môi trường khoáng có thành phần cao nấm men 2%, CH<sub>3</sub>COONa 1%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5%, Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> 1%, Tween 80 0,1%, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,02%, MnSO<sub>4</sub>.4 H<sub>2</sub>O 0,002%, glucoza 2% và NaCl 5%. Kết quả cho thấy sau 4 ngày nuôi cấy số lượng tế bào trên môi trường khoáng thay thế cho số tế bào là  $8,4 \cdot 10^7$  tế bào so với môi trường MRS là  $5,76 \cdot 10^7$ . Kết quả này cho thấy hoàn toàn có thể dùng môi trường khoáng thay thế môi trường MRS truyền thống để tăng sinh tế bào. Môi trường khoáng thay thế có giá thành chỉ bằng 50% so với môi trường MRS chuẩn.

Ví dụ 4: Ứng dụng *Tetragenococcus halophilus* V7-3 làm chủng khởi động để tạo hương vị nước mắm cho dịch thủy phân cá bởi proteaza



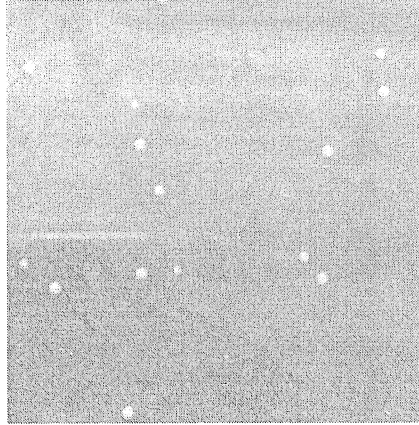
Cá được xay nhỏ, thêm 0,25% (v/w) alcalaza 2,4L và thủy phân ở 65°C trong 2 giờ. Sau đó làm nguội đến 50°C và thêm 0,5% Flavouzyme 500L và ủ trong 4 giờ. Khi nguội đến 35°C thì thêm 25% (w/w) NaCl và giống khởi động để đạt  $10^6$  tế bào/g cá. Quá trình lên men được thực hiện ở nhiệt độ 35°C trong 6 tháng. Nước mắm thu sau 6 tháng lên men bởi *Tetragenococcus halophilus* V7-3 được có hàm lượng nitơ tổng là 21g/L, hàm lượng nitơ amin chiếm 55%, hàm lượng đạm thối chỉ chiếm 15% so với nitơ tổng. Hàm lượng các axit amin tự do chiếm 593mg/L trong đó hàm lượng các axit amin isoleucin và tyrosin tăng từ 2-4 lần so với mẫu kiểm chứng và mẫu lên men bởi các chủng *Tetragenococcus halophilus* khác đạt 130mg/L và 162mg/L. Các hợp chất bay hơi xác định được bao gồm hexan, 3,3-dimetyl-; hexan, 2,4-dimetyl-; axit pentanoic; phenol; axit oxalic, este hexyl neopentylr; axit oxalic, este isohexyl neopentyl; axit sunfuric, este hexyl octyl; 1-hexanol,4-methyl-; axit formic, este octyl; axit formic, este decyl; benzyl 2-chloroethyl sulfon; 1-hexanol; cyclobutaneetanol,b-metylen-; 1,2,3-trimetyldiaziridin; 2-heptanon, 6-metyl-; axit pentanoic, este etyleste 2,2,2-trifloetyl; phenol, 3,5-dimethoxy-; axit dicloaxetic,4-hexaeste decyl; axit terephthalic, este di(2-methoxyetyl).

#### **Hiệu quả đạt được của sáng chế**

Chủng vi khuẩn *Tetragenococcus halophilus* V7-3 theo sáng chế được phân lập từ chượp mắm Cửa Hội, Nghệ An, Việt Nam có khả năng sinh trưởng tốt trên môi trường khoáng thay thế cho MRS có giá thành thấp hơn, có khả năng sinh aminopeptidaza cao và sinh các hợp chất bay hơi. Khi lên men dịch thủy phân protein cá bởi proteaza, chủng *Tetragenococcus halophilus* V7-3 có khả năng tạo hương vị đặc trưng nước mắm chỉ sau 6 tháng lên men. Nước mắm thu sau 6 tháng lên men bởi *Tetragenococcus halophilus* V7-3 được có hàm lượng nitơ tổng là 21g/L, hàm lượng nitơ amin chiếm 55%, hàm lượng đạm thối chỉ chiếm 15% so với nitơ tổng. Hàm lượng các axit amin tự do chiếm 593mg/L trong đó hàm lượng các axit amin isoleucin và tyrosin tăng từ 2-4 lần so với các chủng khác. Điều này đưa ra khả năng ứng dụng chủng vi khuẩn *Tetragenococcus halophilus* V7-3 trong công nghiệp tạo hương vị cho sản xuất nước mắm ngăn ngày thủy phân bằng proteaza.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

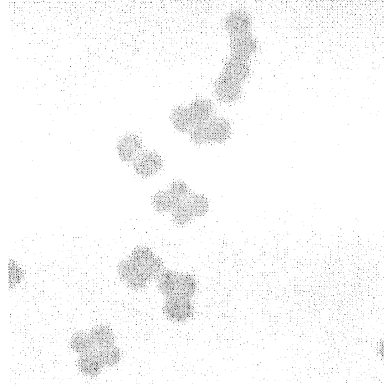
1. Chủng vi khuẩn lactic chịu mặn *Tetragenococcus halophilus* V7-3 thuần khiết về mặt sinh học có trình tự vùng 16s rADN là 1439bp với trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 1, trong đó chủng này có khả năng sinh trưởng tốt trên môi trường khoáng, có khả năng tạo hương vị đặc trưng nước mắm chỉ sau 6 tháng lên men khi lên men dịch thủy phân protein cá bởi proteaza và sản phẩm thu được có hàm lượng nitơ tổng là 21g/L, hàm lượng nitơ amin chiếm 55%, hàm lượng đạm thối chỉ chiếm 15% so với nitơ tổng, hàm lượng các axit amin tự do chiếm 593mg/L, trong đó hàm lượng các axit amin không thay thế isoleucin và tyrosin tăng từ 2-4 lần so với các chủng khác đạt 130mg/L và 160 mg/L.



**Hình 1**

GCTATACATGCAGTCGAACGCTGCTTAAGAAGAAACTTCGGTTTTTTCTTAAGCGGAGTGGCCGACGGGTGAGT  
AACACGTGGGGAACCTATCCATCAGCGGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACGGCTTTTTT  
TCACCTGAAAGAAAGCTCAAAGGCGCTTTACAGCGTCACTGATGGCTGGTCCC GCGGTGCATTAGCCAGTTGGT  
GAGGTAACGGCTCACCAAAGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC  
GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGCAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCG  
TGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTGTCAGCAAAGAACAGGAGAAAGAGGAAATGCTTTTTCT  
ATGACGGTAGCTGACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT  
GTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTGATTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCAGCTCAACTGG  
GGAGGGTCATTGGAAACTGGATCACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCG  
TAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGG  
GTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGC TAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCC  
CTTCAGTGCTGCAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACC GCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATT  
GACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGAC  
ATCCTTTGACCGCCCTAGAGATAGGGTTTTCCCCTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGC  
TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCCTATTGTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGG  
CACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACC  
TGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGCAAGCCAAGCCGCAAGGCC TAGCGAATCTCTGAAAGC  
TTCTCTCAGTTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATG  
CCGCGGTGAATCCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCCAAAGTCGG  
TGCGGCAACCCTTAGGGGAGCCAGCCGCCTAAG

**Hình 2**



Hình 3

## DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI

<120> CHŨNG VI KHUẨN LACTIC CHỊU MẶN *TETRAGENOCOCCUS HALOPHILUS* V7-3

<160> 1

<210> 1

<211> 1439

<212> ADN

<213> *Tetragenococcus halophilus*

<400> 1

GCTATACATG CAGTCGAACG CTGCTTAAGA AGAACTTCG GTTTTTTCTT AAGCGGAGTG 60  
 GCGGACGGGT GAGTAACACG TGGGGAACCT ATCCATCAGC GGGGGATAAC ACTTGGAAC 120  
 AGGTGCTAAT ACCGCATACG GCTTTTTTTC ACCTGAAAGA AAGCTCAAAG GCGCTTTACA 180  
 GCGTCACTGA TGGCTGGTCC CGCGGTGCAT TAGCCAGTTG GTGAGGTAAC GGCTCACCAA 240  
 AGCAACGATG CATAGCCGAC CTGAGAGGGT GATCGGCCAC ACTGGGACTG AGACACGGCC 300  
 CAGACTCCTA CGGGAGGCAG CAGTAGGGAA TCTTCGGCAA TGGACGCAAG TCTGACCGAG 360  
 CAACGCCGCG TGAGTGAAGA AGGTTTTTCG ATCGTAAAGC TCTGTTGTCA GCAAAGAACA 420  
 GGAGAAAGAG GAAATGCTTT TTCTATGACG GTAGCTGACC AGAAAGCCAC GGCTAACTAC 480  
 GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT ACGTAGGTGG CAAGCGTTGT CCGGATTTAT TGGGCGTAAA 540  
 GCGAGCGCAG GCGGTGATTT AAGTCTGATG TGAAAGCCCC CAGCTCAACT GGGGAGGGTC 600  
 ATTGAAACT GGATCACTTG AGTGCAGAAG AGGAGAGTGG AATTCCATGT GTAGCGGTGA 660  
 AATGCGTAGA TATATGGAGG AACACCAGTG GCGAAGGCGG CTCTCTGGTC TGTAAGTAC 720  
 GCTGAGGCTC GAAAGCGTGG GTAGCAAACA GGATTAGATA CCCTGGTAGT CCACGCCGTA 780  
 AACGATGAGT GCTAAGTGTT GGAGGGTTTC CGCCCTTCAG TGCTGCAGTT AACGCATTAA 840  
 GCACTCCGCC TGGGGAGTAC GACCGCAAGG TTGAAACTCA AAGGAATTGA CGGGGGCCCG 900  
 CACAAGCGGT GGAGCATGTG GTTTAATTCG AAGCAACGCG AAGAACCTTA CCAGGTCTTG 960

ACATCCTTTG ACCGCCCTAG AGATAGGGTT TCCCCTTCGG GGGCAAAGTG ACAGGTGGTG 1020  
CATGGTTGTC GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT GTTGGGT'TAA GTCCCGTAAC GAGCGCAACC 1080  
CTTATTGTTA GTTGCCAGCA TTGAGTTGGG CACTCTAGCA AGACTGCCGG TGACAAACCG 1140  
GAGGAAGGCG GGGATGACGT CAAATCATCA TGCCCC'TTAT GACCTGGGCT ACACACGTGC 1200  
TACAATGGGA AGTACAACGA GCAAGCCAAG CCGCAAGGCC TAGCGAATCT CTGAAAGCTT 1260  
CTCTCAGTTC GGATTGCAGG CTGCAACTCG CCTGCATGAA GCCGGAATCG CTAGTAATCG 1320  
CGGATCAGCA TGCCGCGGTG AATCCGTTCC CGGGCCTTGT ACACACCGCC CGTCACACCA 1380  
CGAGAGTTTG TAACACCCAA AGTCGGTGCG GCAACCCTTA GGGGAGCCAG CCGCCTAAG 1439