



DOI:10.22144/ctujos.2025.222

ẢNH HƯỞNG CỦA CHẤT MANG VÀ TỶ LỆ CHỦNG ĐẾN KHẢ NĂNG SỐNG VÀ HOẠT TÍNH PROTEASE CỦA *Bacillus* SPP. TRONG CHẾ PHẨM VI SINH

Đoàn Thị Ngọc Thanh*, Nguyễn Thị Kim Thoa và Bùi Thị Trúc Linh

Trường Đại học Tiền Giang, Việt Nam

*Tác giả liên hệ (Corresponding author): dtnhanh@tgu.edu.vn

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 04/07/2025

Sửa bài (Revised): 30/07/2025

Duyệt đăng (Accepted): 26/10/2025

Title: Effect of carrier and strains ratio on viability and protease activity of *Bacillus* spp. in a probiotic

Author: Doan Thi Ngoc Thanh*, Nguyen Thi Kim Thoa and Bui Thi Truc Linh

Affiliation(s): Tien Giang University, Viet Nam

TÓM TẮT

Phế phụ phẩm từ các cơ sở giết mổ gia cầm ở đồng bằng sông Cửu Long chứa khoảng 15 - 25% protein. Nhiều phương pháp xử lý đã được nghiên cứu để tái sử dụng nguồn protein này trong đó có việc sử dụng vi khuẩn sinh protease. Trong nghiên cứu này, khả năng sống sót và hoạt tính protease của hỗn hợp vi sinh gồm ba chủng *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. flexus*, *B. stratosphericus*) trong các công thức chất mang khác nhau, tỷ lệ vi sinh khác nhau đã được khảo sát. Kết quả cho thấy tỷ lệ 1:1:1 của hỗn hợp vi khuẩn trong chất mang chứa cám gạo 95% và mật đường 5% giúp khả năng sống sót của vi khuẩn và hoạt tính protease được sinh ra cao nhất. Sau 2, 4, 6 tháng bảo quản, từ mật số ban đầu $6,96 \times 10^9$ giảm còn lần lượt là $5,08 \times 10^9$, $3,73 \times 10^9$ và $1,11 \times 10^9$ (CFU/g); hoạt tính protease từ 204,1 UI/g giảm lần lượt còn 187,8; 130,6 và 70,2 (UI/g). Chế phẩm bảo quản sau 2, 4, 6 tháng có khả năng phân giải 53,7%, 47,7% và 39,5% protein tổng số trong phụ phẩm thủy sản.

Từ khóa: *Bacillus*, chất mang, cám gạo, phân giải protein

ABSTRACT

By-products from seafood processing plants in the Mekong Delta contain about 40% protein. Many treatment methods have been studied to reuse this protein source, including the use of protease-producing bacteria. In this study, the survival ability and protease activity of a microbial mixture comprising three *Bacillus* strains (*B. subtilis*, *B. flexus*, and *B. stratosphericus*) in various carrier formulas and at different microbial ratios were investigated. The results showed that a 1:1:1 ratio of the bacterial mixture in a carrier containing 95% rice bran and 5% molasses resulted in the highest survival ability of bacteria and protease activity. After 2, 4, and 6 months of storage, the initial density of 6.96×10^9 decreased to 5.08×10^9 , 3.73×10^9 , and 1.11×10^9 (CFU/g), respectively; while protease activity decreased from 204.1 UI/g to 187.8, 130.6, and 70.2 (UI/g), respectively. The probiotic product preserved after 2, 4, and 6 months was able to decompose 53.7%, 47.7% and 39.5% of total protein in seafood by-products.

Keywords: *Bacillus*, carrier material, protein degradation, rice bran

1. GIỚI THIỆU

Hiện nay, ngành công nghiệp chế biến thủy sản và chế biến gia cầm phát triển mạnh. Tại đồng bằng sông Cửu Long, có gần 300 doanh nghiệp chế biến thủy sản xuất khẩu, 14 cơ sở giết mổ gia cầm, còn có các cơ sở sản xuất quy mô nhỏ (Le, 2014). Một trong những vấn đề của ngành chế biến là phế phụ phẩm được thải ra rất nhiều (Doan & Doan, 2023). Các phụ phẩm đó lại rất giàu protein, có thể dùng để sản xuất chế phẩm có lợi cho nông nghiệp như phân bón cho các loại cây trồng. Ngoài ra, khi các phế phẩm đó được phân giải sẽ giải quyết được vấn đề gây ô nhiễm môi trường của các nhà máy chế biến.

Bên cạnh đó, vấn đề an toàn vệ sinh thực phẩm và sản xuất nông nghiệp hữu cơ ngày càng được quan tâm. Đặc biệt, việc sản xuất nông nghiệp theo hướng hữu cơ cần dùng phân bón hữu cơ hiện nay vừa đảm bảo năng suất và chất lượng không thua kém so với việc dùng phân bón hóa học. Do đó, việc xử lý phế phẩm giàu protein tạo ra sản phẩm phân bón sinh học sẽ giải quyết được việc ô nhiễm môi trường mà còn tạo ra dạng phân bón giàu đạm cho cây trồng (Le & Nguyen, 2016; Doan & Doan, 2023).

Để phân giải protein, protease từ nhiều nguồn khác nhau có thể được sử dụng như động vật, thực vật hoặc vi sinh vật. Quá trình phân giải có thể dùng enzyme đã tinh sạch với điều kiện thủy phân nghiêm ngặt để tránh việc mất hoạt tính của enzyme, hoặc có thể dùng chế phẩm vi sinh sản sinh protease. Việc sử dụng nhiều chủng vi sinh vật sống có khả năng sinh nhiều loại enzyme để xử lý những phế phụ phẩm của công nghiệp chế biến là một trong những phương pháp được quan tâm và mang tính khả thi cao (Maragkoudakis et al., 2006; Dias et al., 2008; Tran et al., 2012; Doan & Doan, 2023).

Những chủng *Bacillus* spp. được phân lập từ ao nuôi thủy sản cho thấy khả năng sinh protease ngoại bào cao (Nguyen & Phan, 2014; Doan & Doan, 2023). Bên cạnh đó, để tạo ra chế phẩm có khả năng bảo quản vi sinh và giúp chúng duy trì khả năng tiết enzyme, cần quan tâm đến những yếu tố ảnh hưởng như chất mang, tỷ lệ các chủng vi sinh. Kết quả các nghiên cứu trước đây cho thấy tỷ lệ các chủng vi sinh trong hỗn hợp thay đổi theo từng chế phẩm, và một số chất mang thường được sử dụng là than bùn, bột talc, bột bắp, ri đường theo các tỷ lệ khác nhau (Pham et al., 2013; Nguyen et al., 2016; Dang et al., 2019). Vì vậy, đặc tính sinh enzyme, công thức chất mang để bảo quản các chủng vi khuẩn này được nghiên cứu để định hướng ứng dụng chúng trong phân hủy các phế phẩm giàu protein từ nhà máy chế

biến thủy sản hay xử lý nguồn phụ phẩm này trong tương lai (Boominadhan, 2009; Bajaj et al., 2013; Dang et al., 2017; Singh & Bajaj, 2016, 2017).

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Ba chủng vi sinh vật được tuyển chọn để thử nghiệm là *Bacillus subtilis* (T17), *Bacillus stratosphericus* (T24), *Bacillus flexus* (T36) được phân lập và định danh trong nghiên cứu của Doan and Doan (2023) được lưu trữ tại Trường Đại học Tiền Giang.

Nguyên liệu chất mang được sử dụng trong nghiên cứu là than bùn (hiệu Mạnh Hùng) có màu đen than, kích thước 2 – 2,5 mm, độ ẩm từ 20 đến 30%; bột talc có màu trắng xanh, dạng bột mịn, độ ẩm 1% (hiệu Nam Hải); bột cám gạo thô (từ nhà máy Nam Hải 2) có màu vàng cam nhạt sáng tự nhiên, dạng bột khá mịn, xốp, độ ẩm khoảng 12%; mật ri đường tại cơ sở sản xuất đường kết tinh Thuận Tâm, Mỹ Tho và phế phẩm thủy sản được thu từ nhà máy chế biến thủy sản tại khu công nghiệp Mỹ Tho, Tiền Giang. Các hóa chất được mua từ hãng Himedia, Ấn độ và Merck, Đức.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp hoạt hóa, nhân sinh khối và chủng vi sinh vật vào chất mang

Một khuẩn lạc từ đĩa petri sau 24 giờ nuôi cấy của các chủng *Bacillus* spp. được chọn cấy vào 5 mL môi trường LB lỏng để hoạt hóa giống, tiếp tục cấy chuyển sang 250 mL môi trường nhân giống cấp II (cao nấm men 12,5 g/L, K₂HPO₄ 0,25 g/L, ri đường 25 g/L) và nuôi lắc 150 vòng/phút ở 30°C.

Các chủng *Bacillus* spp. sau khi nhân sinh khối được tiến hành kiểm tra mật số bằng phương pháp so sánh mật độ quang OD_{600nm} với dung dịch McFarland. Sau khi dịch nuôi cấy đạt mật số 10⁹ CFU/mL, 30 mL dịch sinh khối chủng được sử dụng vào 100 g chất mang đã hấp khử trùng và sấy khô. Sau khi chủng dịch sinh khối vào chất mang sẽ tiến hành sấy ở nhiệt độ 40°C, độ ẩm được kiểm tra định kỳ mỗi 20 phút bằng máy Soil Tester – Japan đến khi đạt 20 - 25% thì tiến hành kiểm tra mật số vi sinh tại thời điểm 0 ngày. Chế phẩm được bảo quản ở nhiệt độ 28 – 30°C ở nơi khô ráo, tránh ánh nắng mặt trời; sau thời gian bảo quản nhất định, mật số vi sinh trong chế phẩm sẽ tiếp tục được kiểm tra bằng phương pháp ở mục 2.2.2.

2.2.2. Phương pháp khảo sát mật số các chủng *Bacillus spp.* trong chế phẩm sau thời gian tồn trữ

Đầu tiên, 10 g chế phẩm được cân, cho vào 90 mL nước muối sinh lý và đồng nhất mẫu bằng máy lắc trong 1 giờ ở 150 vòng/phút, sau đó tiếp tục pha loãng thành các độ pha loãng 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} .

Cấy trang: 100 µL huyền phù vi khuẩn đã được pha loãng về nồng độ thích hợp được hút vào đĩa môi trường LB agar và trang đều trên bề mặt môi trường bằng que cấy, sau đó ủ đĩa ở 30°C. Sau 24 giờ, việc đếm số khuẩn lạc được hình thành và tính mật số vi khuẩn được tiến hành. Số tế bào vi khuẩn sống sót được xác định theo phương pháp của Maragkoudakis et al (2006). Số tế bào vi khuẩn trong 1 mL hoặc 1 g mẫu (CFU: colony forming units)

$$N = \frac{\sum C}{n_1 v d_1 + \dots + n_i v d_i}$$

Trong đó:

N là số tế bào (đơn vị hình thành khuẩn lạc) vi khuẩn trong 1 mL hoặc 1 g mẫu,

C là tổng số khuẩn lạc đếm được trên các hộp petri đã chọn,

n_i là số đĩa petri cấy tại độ pha loãng thứ i ,

d_i là hệ số pha loãng tương ứng,

v là thể tích dịch mẫu (mL) cấy vào trong mỗi đĩa.

2.2.3. Thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của chất mang đến mật số vi sinh và hoạt tính protease của chế phẩm

Thí nghiệm được thực hiện trên từng chủng, mỗi chủng với 10 nghiệm thức chất mang (Bảng 1), mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần, mỗi lần là 100 g chất mang. Thông số nghiệm thức được tham khảo từ Nguyen et al. (2016).

Các loại chất mang được rây (kích thước 0,5 mm) nhằm loại bỏ tạp chất, đá sỏi, lá cây trước khi sử dụng. Sau đó, các loại chất mang được phối trộn theo các công thức thí nghiệm và chỉnh pH của chất mang từ 6,5 đến 7 bằng vôi. Tiếp đến, việc phân phối chất mang đã được phối trộn vào từng gói PE chịu nhiệt với khối lượng mỗi gói là 100 g, bịt kín bằng nút bông không thấm và hấp khử trùng ở 121°C, 1 atm, 20 phút, sau đó sấy khô các gói chất mang ở 40°C đến khi đạt độ ẩm 8 - 10% và chủng vi sinh như mục 2.2.1. Tại thời điểm 0 ngày và 30 ngày,

việc kiểm tra mật số vi sinh và hoạt tính protease được tiến hành.

Bảng 1. Các nghiệm thức phối trộn chất mang (%)

Nghiệm thức	Than bùn	Bột talc	Cám gạo	Rỉ đường
NT1	100	–	–	–
NT2	–	100	–	–
NT3	–	–	100	–
NT4	33,3	33,3	33,3	–
NT5	25	25	25	–
NT6	50	25	25	–
NT7	25	25	50	–
NT8	95	–	–	5
NT9	–	95	–	5
NT10	–	–	95	5

2.2.4. Thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ vi sinh đến mật số vi sinh và hoạt tính protease của chế phẩm

Sau khi chọn công thức chất mang tốt cho cả 3 chủng. Tỷ lệ của 3 chủng vi sinh được phối trộn như Bảng 2 và được chủng vào các gói chất mang như mục 2.2.1.

Bảng 2. Các nghiệm thức tỷ lệ phối trộn giống

Nghiệm thức	T36	T17	T24
NT1	1	1	–
NT2	1	2	–
NT3	2	1	–
NT4	1	–	1
NT5	1	–	2
NT6	2	–	1
NT7	–	1	1
NT8	–	1	2
NT9	–	2	1
NT10	1	1	1
NT11	1	1	2
NT12	1	2	1
NT13	2	1	1

Tổng thể tích vi sinh được chủng vào được cố định ở 30 mL. Tại thời điểm 0 ngày và 30 ngày, mật số vi sinh và hoạt tính protease được xác định.

2.2.5. Thí nghiệm khả năng thủy phân protein từ phế phẩm thủy sản của chế phẩm vi sinh tạo thành

Phế phụ phẩm thủy sản từ nhà máy chế biến, ở thí nghiệm này nhóm nghiên cứu dùng cá xay nhuyễn với nước theo tỷ lệ 1:1. Tiếp theo, 80 g chế phẩm vi sinh đã tạo (sau thời gian bảo quản 2, 4 và

6 tháng) được bổ sung vào 1 kg hỗn hợp trên để đảm bảo mật số vi sinh theo khuyến nghị (Tran et al., 2023, Vajihch et al., 2024) và ủ ở nhiệt độ phòng. Hàm lượng protein tổng số được đo tại thời điểm 0 ngày và 30 ngày sau ủ. Nghiệm thức đối chứng là hỗn hợp phụ phẩm không bổ sung chế phẩm vi sinh.

2.2.6. Phương pháp kiểm tra hoạt độ enzyme protease của các chủng *Bacillus spp.* trong chế phẩm vi sinh

Trước tiên, 10 g chế phẩm được cân và hòa vào 90 mL nước cất vô trùng, đồng nhất mẫu và ly tâm thu dịch vi khuẩn (loại bỏ cặn). Hoạt độ enzyme protease được thực hiện theo phương pháp Anson (1938) cải tiến, cụ thể như sau:

Bảng 3. Các bước dựng đường chuẩn tyrosin

Dung dịch hóa chất	Ống nghiệm số					
	1	2	3	4	5	6
Dung dịch tyrosin chuẩn (mL)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Lượng tyrosin tương ứng (µM)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Dung dịch HCl 0,2N (mL)	5,0	4,8	4,6	4,4	4,2	4,0
Dung dịch NaOH 0,5N (mL)	10	10	10	10	10	10
Thuốc thử Folin 1 M (mL)	3	3	3	3	3	3

Lắc mạnh, sau 10 phút đo OD ở bước sóng 660nm

Dựng đường chuẩn tyrosin: các bước dựng đường chuẩn tyrosin được thể hiện trong Bảng 3.

Ống số 1 là ống đối chứng không chứa tyrosin, ống số 2 đến 6 có nồng độ tyrosin tăng dần. Đồ thị biểu diễn sự biến thiên mật số quang (ΔOD) được vẽ theo lượng tyrosin tương ứng. Đường tương quan tuyến tính được xác định theo công thức:

$$y = ax + b.$$

Do hoạt tính protease: Dịch chứa protease được cho vào 2 ống nghiệm, 1 ống đối chứng và 1 ống thí nghiệm, lặp lại 3 lần. Thành phần phản ứng được cho vào ống nghiệm theo thứ tự như Bảng 4.

Bảng 4. Thành phần phản ứng đo hoạt tính protease

Dung dịch hóa chất	Ống nghiệm	
	Thí nghiệm	Đối chứng
Dung dịch casein 1% (mL)	5	5
Dung dịch TCA 5% (mL)	0	10
Dung dịch enzyme mẫu (mL)	1	1
Lắc đều và giữ ở 35,5°C trong 20 phút		
Dung dịch TCA 5% (mL)	10	0
Để yên 30 phút, lọc lấy dịch trong		

Sau 30 phút, 2,5 mL dịch lọc của mỗi ống được hút cho vào ống nghiệm sạch mới, bổ sung 5 mL NaOH và 1,5 mL Folin, lắc mạnh, sau 10 phút đo OD ở bước sóng 660 nm. Dựa vào đường chuẩn Tyrosin suy ra được số µM tyrosin có trong mẫu.

Tính kết quả hoạt tính protease:

$$\text{Hoạt tính} = (\mu\text{M tyrosin} * V * L) / (t * v)$$

V: tổng thể tích hỗn hợp trong ống (16 mL),

v: thể tích dịch lọc đem phân tích (2,5 mL),

t: thời gian thủy phân (30 phút),

L: độ pha loãng enzyme (nếu có),

µM tyrosin: lượng µM tyrosin trong v (mL) từ đường chuẩn.

2.2.7. Định lượng protein trong mẫu thủy phân bằng phương pháp Bradford (Bradford, 1976)

Để xác định protein trong mẫu, việc xây dựng đường chuẩn với dung dịch protein chuẩn được tiến hành, cân 10 mg albumin bằng cân phân tích, pha trong 1 mL nước cất, lắc đều cho tan và giữ ở -20°C. Khi dùng pha loãng ra 100 lần, được dung dịch có nồng độ 0,1 mg/mL.

Mẫu thí nghiệm được trộn đều và lấy ngẫu nhiên 15 mL, ly tâm ở 6.000 vòng/phút, 30 phút rồi lấy phần dịch nổi xác định hàm lượng protein.

Sau 20 phút cho thuốc thử, độ hấp thụ của dung dịch ở bước sóng 595 nm được tiến hành đo. Đường tuyến tính được dựng giữa nồng độ protein (µg/mL) với mật số quang OD₅₉₅. Hàm lượng protein ở trong mẫu phân tích X có công thức: Protein (mg/g) = P x V/m với V = thể tích dung dịch trích ly (mL), m = khối lượng mẫu (g).

2.2.8. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thu được từ thí nghiệm xác định chất mang thích hợp với các chủng *Bacillus spp.* và thí nghiệm tỷ lệ phối trộn 3 chủng giống được thống kê bằng kiểm định ANOVA.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát chất mang thích hợp để tạo chế phẩm vi sinh

thực nghiệm ở Bảng 1, kết quả mật số vi khuẩn và hoạt tính protease sau 0 ngày và 30 ngày khi tạo chế phẩm được thể hiện qua Bảng 5 và Bảng 6.

Đối với mỗi chủng, cấy 30 mL dịch nuôi cấy cấp II vào 100 g chất mang được chuẩn bị theo các

Bảng 5. Mật số của chủng *Bacillus flexus* (T36), *Bacillus stratosphericus* (T24), *Bacillus subtilis* (T17) trong các nghiệm thức chất mang

Nghiệm thức	Thời gian		
	0 ngày ($\times 10^9$ CFU/g)	30 ngày ($\times 10^9$ CFU/g)	Tỷ lệ sống (%)
T36			
NT1	0,026 ^h \pm 0,0009	0,019 ^g \pm 0,0003	74,8 ^d \pm 2,31
NT2	0,058 ^{gh} \pm 0,0009	0,042 ^g \pm 0,0002	72,5 ^d \pm 1,16
NT3	2,340 ^c \pm 0,0721	1,980 ^c \pm 0,0608	84,6 ^b \pm 1,74
NT4	2,930 ^b \pm 0,0819	2,210 ^b \pm 0,1308	75,4 ^d \pm 2,48
NT5	0,787 ^f \pm 0,0027	0,612 ^f \pm 0,0017	77,8 ^{cd} \pm 0,06
NT6	1,120 ^c \pm 0,0361	0,947 ^c \pm 0,0110	85,4 ^b \pm 2,69
NT7	1,940 ^d \pm 0,0458	1,670 ^d \pm 0,0200	86,1 ^b \pm 1,04
NT8	0,120 ^g \pm 0,0027	0,097 ^g \pm 0,0064	80,8 ^{bc} \pm 5,81
NT9	0,110 ^g \pm 0,0050	0,089 ^g \pm 0,0029	80,9 ^{bc} \pm 6,31
NT10	3,560 ^a \pm 0,0608	3,270 ^a \pm 0,0200	91,9 ^a \pm 1,08
F tính	**	**	**
CV (%)	3,44	4,10	3,89
T24			
NT1	0,54 ^f \pm 0,015	0,37 ^g \pm 0,003	69,5 ^c \pm 2,06
NT2	0,26 ^g \pm 0,006	0,16 ^h \pm 0,002	61,4 ^d \pm 1,96
NT3	2,93 ^c \pm 0,036	2,37 ^b \pm 0,026	80,9 ^b \pm 1,02
NT4	3,10 ^b \pm 0,173	2,20 ^c \pm 0,026	71,0 ^c \pm 3,63
NT5	2,33 ^c \pm 0,020	1,63 ^c \pm 0,026	70,0 ^c \pm 1,62
NT6	2,45 ^d \pm 0,017	2,01 ^d \pm 0,079	82,0 ^b \pm 3,80
NT7	2,51 ^d \pm 0,026	2,19 ^c \pm 0,036	87,3 ^a \pm 1,98
NT8	0,89 ^f \pm 0,011	0,74 ^f \pm 0,004	82,9 ^b \pm 1,17
NT9	0,54 ^g \pm 0,003	0,43 ^g \pm 0,003	79,1 ^b \pm 0,57
NT10	3,59 ^a \pm 0,017	3,19 ^a \pm 0,062	88,9 ^a \pm 1,88
F tính	**	**	**
CV (%)	2,86	2,07	2,85
T17			
NT1	0,34 ^f \pm 0,01	0,24 ^c \pm 0,01	70,0 ^d \pm 2,64
NT2	0,38 ^f \pm 0,02	0,22 ^c \pm 0,02	68,8 ^d \pm 5,12
NT3	3,28 ^{bc} \pm 0,09	2,59 ^c \pm 0,02	79,0 ^c \pm 2,69
NT4	3,43 ^b \pm 0,13	2,86 ^b \pm 0,04	83,4 ^{bc} \pm 3,88
NT5	2,65 ^c \pm 0,11	2,10 ^d \pm 0,16	73,6 ^c \pm 3,67
NT6	3,05 ^d \pm 0,05	2,59 ^c \pm 0,19	80,1 ^{de} \pm 1,55
NT7	3,19 ^{cd} \pm 0,03	2,78 ^b \pm 0,03	87,1 ^b \pm 0,72
NT8	0,37 ^f \pm 0,02	0,31 ^e \pm 0,02	82,7 ^d \pm 1,26
NT9	0,35 ^f \pm 0,01	0,30 ^e \pm 0,02	84,0 ^{de} \pm 2,31
NT10	3,68 ^a \pm 0,20	3,40 ^a \pm 0,02	92,4 ^a \pm 4,66
F tính	**	**	**
CV (%)	4,33	4,46	3,90

Các số trong cùng một cột có cùng chữ theo sau thì khác biệt không ý nghĩa ở mức 1%.

Từ Bảng 5, tại thời điểm 0 ngày sau khi tạo chế phẩm, mặc dù lượng tế bào được chủng vào chất mang như nhau, nhưng sau khi sấy đến độ ẩm cần thiết và bắt đầu bảo quản, mật số tế bào vi khuẩn lại có sự khác biệt. Các nghiệm thức NT1 (100% than bùn), NT2 (100% bột talc), NT8 (95% than bùn + 5% ri đường), NT9 (95% bột talc + 5% ri đường) có lượng tế bào giảm nhiều nhất chỉ còn khoảng 10^7 CFU/g, riêng các nghiệm thức NT3 (100% cám gạo), NT4 (33,3% than bùn + 33,3% bột talc + 33,3% cám gạo), NT5 (25% than bùn + 50% bột talc + 25% cám gạo), NT6 (50% than bùn + 25% bột talc + 25% cám gạo), NT7 (50% than bùn + 25% bột talc + 25% cám gạo), NT10 (95% cám gạo + 5% ri đường) vẫn duy trì được mật số tế bào cao trên 10^8 CFU/g. Trong đó, NT10 cho mật số tế bào cao nhất với kết quả lần lượt ở 3 chủng là $3,56 \pm 0,0608 \times 10^9$ CFU/g (T36), $3,59 \pm 0,017 \times 10^9$ CFU/g (T24) và $3,68 \pm 0,20$ CFU/g (T17). Các nghiệm thức sử dụng cám gạo làm chất mang sẽ cho mật số tế bào cao hơn so với sử dụng chất mang là than bùn và bột talc. Cám gạo có khả năng bảo vệ vi sinh vật khỏi tác động của nhiệt độ, cám gạo hút nước vào từng phân tử làm sự hydrate hóa các phân tử tinh bột có trong cám nên mặc dù độ ẩm của các chế phẩm là như nhau nhưng lượng phân tử nước liên kết với cám gạo nhiều hơn, chính các phân tử này sẽ giúp duy trì mật số tế bào cho vi sinh vật (Gabriela et al., 2019; Kaur et al., 2023). Đồng thời, *Bacillus* spp. có khả năng

tạo bào tử trong điều kiện khắc nghiệt, tuy nhiên tại thời điểm này thì *Bacillus* spp. chưa sử dụng được các chất dinh dưỡng để tạo bào tử nên mật số tế bào giảm so với mật số nhân giống cấp hai.

Tại thời điểm 30 ngày sau khi tạo chế phẩm, mật số tế bào vi khuẩn trong các chế phẩm đều giảm, duy trì ở mức 10^7 CFU/g trở lên và phù hợp với tiêu chuẩn để sản xuất chế phẩm hữu cơ vi sinh (TT 36/2010 BNNPTNT). Trong đó mật số vi khuẩn ở nghiệm thức NT10 cho giá trị cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại, với tỷ lệ mật số tế bào sau 30 ngày bảo quản là 91,9% (T36), 88,9% (T24) và 92,4% (T17) Vi sinh vật sử dụng các chất dinh dưỡng từ chất mang để duy trì sự sống, trong đó nguồn Cacbon (C) và đạm (N) có vai trò quan trọng trong sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật. Ri đường là nguồn cung cấp Cacbon cho vi sinh vật phát triển đặc biệt là lượng đường đôi còn sót lại, do đó, với cùng loại chất mang nhưng nếu có bổ sung thêm mật ri đường thì sẽ cho mật số tế bào cao hơn, cụ thể như ở NT8 ($0,097 \pm 0,0064 \times 10^9$ CFU/g) cao hơn NT1 ($0,019 \pm 0,0003 \times 10^9$ CFU/g) ở chủng T36 và kết quả tương tự ở hai chủng còn lại (Bảng 7). Cám gạo có chứa hàm lượng dinh dưỡng khá cao, trong đó protein chiếm tới 12,7%, glucid 56,1%, lipid 18,4% (Nguyen et al., 2015), vì vậy cám gạo là nguồn chất mang tốt giúp duy trì mật số vi khuẩn.

Bảng 6. Hoạt tính các chủng *Bacillus flexus* (T36), *Bacillus stratosphericus* (T24), *Bacillus subtilis* (T17) trong các nghiệm thức chất mang

Nghiệm thức	Thời gian		Tỷ lệ (%)
	0 ngày (UI/g)	30 ngày (UI/g)	
T36			
NT1	25,2 ⁱ ±1,37	11,4 ^f ±2,04	44,8 ^e ±10,4
NT2	24,5 ^j ±0,95	18,9 ^c ±2,13	77,1 ^c ±5,79
NT3	59,1 ^d ±2,05	45,6 ^d ±3,06	77,2 ^c ±4,37
NT4	72,6 ^c ±2,41	63,7 ^c ±3,10	87,7 ^{ab} ±6,53
NT5	35,8 ^f ±2,33	18,9 ^e ±0,98	52,8 ^{de} ±5,44
NT6	42,6 ^e ±1,23	10,1 ^f ±0,05	24,0 ^f ±0,57
NT7	89,3 ^b ±1,67	73,8 ^b ±1,08	82,6 ^{bc} ±2,70
NT8	33,7 ^g ±0,25	15,5 ^c ±0,95	45,9 ^e ±2,70
NT9	30,5 ^h ±0,53	18,1 ^e ±1,11	59,3 ^d ±2,66
NT10	116 ^a ±0,95	109 ^a ±3,35	94,4 ^a ±3,06
F tính	**	**	**
CV (%)	2,91	5,39	7,95
T24			
NT1	27,1 ^{hi} ±1,89	11,3 ^g ±0,46	41,7 ^f ±1,25
NT2	25,1 ⁱ ±2,31	9,66 ^g ±0,63	38,5 ^f ±5,24
NT3	94,9 ^b ±2,52	71,2 ^c ±1,02	75,0 ^c ±2,72
NT4	87,3 ^d ±1,99	63,7 ^d ±0,50	73,0 ^c ±1,99
NT5	32,4 ^h ±1,39	20,3 ^c ±1,57	62,7 ^d ±4,87
NT6	41,3 ^c ±2,51	18,6 ^c ±1,56	45,0 ^{ef} ±1,17

Nghiệm thức	Thời gian		Tỷ lệ (%)
	0 ngày (UI/g)	30 ngày (UI/g)	
NT7	91,0 ^c ±1,81	74,5 ^b ±1,58	81,8 ^b ±2,09
NT8	33,0 ^f ±1,86	16,1 ^f ±1,39	48,7 ^e ±4,74
NT9	29,1 ^g ±1,21	18,3 ^{ef} ±1,85	62,4 ^d ±3,82
NT10	101 ^a ±2,44	95,1 ^a ±1,74	93,8 ^a ±3,62
F tính	**	**	**
CV (%)	2,86	3,34	5,56
T17			
NT1	65,3 ^c ±2,17	38,1 ^e ±2,18	62,1 ^d ±10,40
NT2	43,0 ^b ±1,62	24,4 ^e ±2,00	56,7 ^d ±5,79
NT3	95,7 ^c ±2,05	71,3 ^d ±2,34	74,4 ^c ±4,37
NT4	104 ^b ±1,34	87,1 ^b ±2,03	84,2 ^{bc} ±6,52
NT5	60,5 ^f ±2,17	33,1 ^f ±2,94	81,4 ^c ±5,44
NT6	71,0 ^d ±2,23	39,2 ^e ±1,94	78,0 ^{bc} ±0,57
NT7	97,1 ^c ±1,27	79,6 ^c ±2,15	82,0 ^b ±2,70
NT8	55,2 ^f ±1,58	33,7 ^f ±1,60	61,0 ^{bc} ±2,70
NT9	47,7 ^g ±2,37	26,7 ^g ±2,24	56,0 ^{bc} ±2,66
NT10	117 ^a ±1,91	105 ^a ±2,44	89,0 ^a ±3,06
F tính	**	**	**
CV (%)	2,52	2,86	4,74

Các số trong cùng một cột có cùng chữ theo sau thì khác biệt không ý nghĩa ở mức 1%.

Kết quả trong thí nghiệm khảo sát chất mang thích hợp đối với cả 3 chủng *B.subtilis*, *B.flexus*, *B.stratophericus* ở Bảng 6 ta thấy được rằng, hoạt tính protease ở 0 ngày ở các nghiệm thức là khác biệt với nhau là do ảnh hưởng của quá trình sấy, nhiệt độ là nguyên nhân chính làm cho hoạt tính protease bị giảm. Các nghiệm thức có chất mang là bột talc (NT2, NT5, NT9) sẽ cho hoạt tính protease thấp, do bột talc có chứa hàm lượng muối cao sẽ ức chế hoạt động của các gen sản sinh protease ngoại bào của vi khuẩn, làm cho hoạt tính giảm (Liu et al., 2015). Tuy nhiên ở NT10 (95% cám gạo + 5% ri đường) hoạt tính protease có giá trị cao ở 0 ngày và 30 ngày. Đồng thời, hoạt tính và mật số còn lại cũng được duy trì trên 80% ở cả ba chủng *B.subtilis*, *B.flexus*, *B.stratophericus*. Vì vậy nhóm nghiên cứu chọn NT10 để tiến hành thí nghiệm tiếp theo. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của nhiều tác giả. Kết quả nghiên cứu của Dang et al. (2017) cũng đã cho thấy cám gạo là chất mang giúp duy trì được mật số tốt nhất. Theo nghiên cứu của Shikha et al. (2007) đã có kết luận việc sử dụng mật ri đường trong môi trường nuôi cấy sẽ tăng hoạt tính protease kiềm của các chủng *Bacillus*. Kết quả từ nghiên cứu này đã giúp khẳng định thêm kết luận trên. Các nghiệm thức có bổ sung mật ri đường cho hoạt tính protease cao hơn so với các nghiệm thức không bổ

sung mật ri đường (so sánh giữa nghiệm thức NT1 và NT8, NT2 và NT9, NT3 và NT10).

Trước đó, Uyar and Baysal (2004) ở Thổ Nhĩ Kỳ đã nghiên cứu ảnh hưởng của cám lúa mì và trấu đến sản xuất protease kiềm từ *Bacillus* spp. cho thấy cám lúa mì giúp việc sản xuất enzyme cao nhất, sản lượng tối đa 429,041 (UI/g) và 168,640 (UI/g) đã đạt được bằng cách sử dụng cám lúa mì và trấu làm chất mang. Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu sản xuất protease kiềm của Shikha et al. (2007) tại Ấn Độ cho thấy trong môi trường mật mía (242 UI/g), môi trường mật mía và cám lúa mì (285 UI/g). Như vậy, giá trị hoạt tính protease trong các nghiên cứu này cao hơn so với thí nghiệm đã khảo sát nhưng chất mang là cám vẫn cho hoạt tính cao nhất tương tự với các nghiên cứu trên.

3.2. Khảo sát sự ổn định của hỗn hợp vi sinh trong chất mang

Sau khi xác định được loại chất mang thích hợp cho các chủng *Bacillus* spp. là 95% cám gạo + 5% ri đường tiến hành phối trộn các chủng *Bacillus* spp. Kết quả kiểm tra mật số vi sinh và hoạt tính protease các chủng T36, T24 và T17 khi được chủng vào hỗn hợp chất mang 95% cám gạo + 5% ri đường tại các thời điểm 0 ngày và 30 ngày sau khi tạo chế phẩm được trình bày trong Bảng 7.

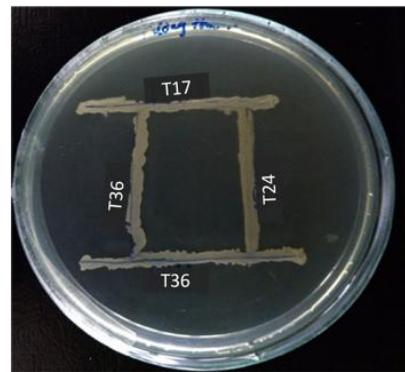
Bảng 7. Mật số và hoạt tính protease của các hỗn hợp vi sinh trong 95% cám gạo + 5%

Nghiệm thức	Mật số			Hoạt tính		
	0 ngày ($\times 10^9$ CFU/g)	30 ngày ($\times 10^9$ CFU/g)	Tỷ lệ (%)	0 ngày (UI/g)	30 ngày (UI/g)	Tỷ lệ (%)
NT1	4,45 ^c \pm 0,087	3,74 ^c \pm 0,070	84,0	91,71 ^c \pm 1,84	76,12 ^c \pm 0,98	83,0
NT2	4,38 ^c \pm 0,070	3,71 ^c \pm 0,090	84,7	90,05 ^c \pm 1,66	75,32 ^c \pm 1,46	83,6
NT3	4,42 ^c \pm 0,036	3,68 ^c \pm 0,070	83,3	92,61 ^c \pm 2,31	74,74 ^{cd} \pm 1,44	80,7
NT4	3,75 ^{dc} \pm 0,056	3,17 ^d \pm 0,130	84,5	83,62 ^{ef} \pm 1,08	66,39 ^g \pm 0,66	79,4
NT5	3,84 ^{dc} \pm 0,045	3,21 ^d \pm 0,125	83,6	81,91 ^f \pm 1,63	67,12 ^{fg} \pm 1,26	81,9
NT6	3,81 ^{dc} \pm 0,026	3,25 ^d \pm 0,122	85,3	84,32 ^{ef} \pm 0,74	68,31 ^{fg} \pm 1,48	81
NT7	3,72 ^c \pm 0,061	3,13 ^d \pm 0,072	84,1	86,09 ^{de} \pm 0,90	69,13 ^{ef} \pm 1,04	82,3
NT8	3,87 ^d \pm 0,141	3,18 ^d \pm 0,090	82,2	87,13 ^d \pm 0,93	70,59 ^e \pm 0,94	81
NT9	3,77 ^{dc} \pm 0,046	3,15 ^d \pm 0,080	83,6	82,09 ^f \pm 2,22	72,66 ^d \pm 1,15	88,4
NT10	5,19 ^a \pm 0,017	4,78 ^a \pm 0,082	92,1	141,6 ^a \pm 1,48	126,2 ^a \pm 1,09	89,1
NT11	5,21 ^a \pm 0,020	4,41 ^b \pm 0,061	84,6	97,17 ^b \pm 1,82	80,75 ^b \pm 1,41	83,1
NT12	5,08 ^{ab} \pm 0,030	4,44 ^b \pm 0,081	87,4	96,51 ^b \pm 0,53	81,94 ^b \pm 1,20	84,9
NT13	5,03 ^b \pm 0,160	4,39 ^b \pm 0,055	87,3	89,93 ^c \pm 1,73	73,11 ^d \pm 1,15	81,3
F tính	**	**		**	**	
CV (%)	1,78	2,83		1,67	1,55	

Các số trong cùng một cột có cùng chữ theo sau thì khác biệt không ý nghĩa ở mức 1%.

Tại thời điểm 0 ngày, mật số vi khuẩn của các nghiệm thức dao động ở mức từ $3,72 \pm 0,061 \times 10^9$ đến $5,21 \pm 0,020 \times 10^9$ CFU/g. Trong đó, NT10 và NT11 khác biệt có ý nghĩa thống kê với các nghiệm thức còn lại. Các chủng *Bacillus* có khả năng chịu nhiệt, trong thời gian sấy vi khuẩn vẫn có thời gian tăng trưởng nhưng không cao, do nhiệt độ sấy 40°C không phải là nhiệt độ thích hợp cho vi khuẩn phát triển (Kexin et al., 2022).

Tại thời điểm 30 ngày sau khi tạo chế phẩm, mật số vi khuẩn của các nghiệm thức giảm so với thời điểm 0 ngày sau khi tạo chế phẩm, mật số vi khuẩn dao động từ $3,13 \pm 0,072 \times 10^9$ đến $4,78 \pm 0,082 \times 10^9$ CFU/g. Trong đó mật số vi khuẩn ở NT10 khác biệt có ý nghĩa với các nghiệm thức còn lại, mật số vi khuẩn duy trì 92,1% ở nghiệm thức này và trên 80% ở các nghiệm thức còn lại. Mặc dù cùng loại chất mang được chọn (95% cám gạo + 5% ri đường), mật số vi khuẩn được chủng vào là như nhau nhưng ở các nghiệm thức chỉ sử dụng một chủng vi khuẩn sẽ cho mật số tế bào vi khuẩn thấp hơn so với khi phối trộn các chủng vi khuẩn lại với nhau. Tại thời điểm 0 ngày sau khi tạo chế phẩm ở NT10 khi chỉ sử dụng chủng T36 thì mật số tế bào là $3,56 \pm 0,061 \times 10^9$ CFU/g cho kết quả mật số thấp hơn NT10 trong thí nghiệm này khi phối trộn 3 chủng T36:T24:T17 (1:1:1) là $5,19 \pm 0,017 \times 10^9$ CFU/g. Các chủng vi khuẩn này tương thích không cạnh tranh với nhau khi kiểm tra bằng phương pháp cấy chữ T trên đĩa thạch (Hình 1), vì vậy chúng phát triển tự do trong môi trường tối ưu được chọn là 95% cám gạo + 5% ri đường.



Hình 1. Ba chủng phát triển tương thích trên môi trường LB agar

Hoạt tính protease của các nghiệm thức tại thời điểm 0 ngày đạt giá trị cao trên 80 UI/g. Giá trị hoạt tính protease ở nghiệm thức NT4 (1T36 : 1T24), NT5 (1T36 : 2T24), NT6 (2T36 : 1T24), NT7 (1T17 : 1T24), NT8 (1T17 : 2T24), NT9 (2T17 : 1T24) thấp hơn các nghiệm thức còn lại và không có sự khác biệt về mật số thống kê với nhau. Ở NT10 (1:1:1) có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với các nghiệm thức còn lại với hoạt tính protease cao lên đến 141,61 UI/g. Khi phối trộn cả ba chủng *Bacillus* với nhau thì các tỷ lệ còn lại NT11(1:1:2), NT12(1:2:1), NT13(2:1:1) đều có hoạt tính thấp hơn NT10, có thể là do ở các tỷ lệ này ba chủng tiết ra hàm lượng enzyme không đều nhau.

Sau 30 ngày bảo quản, hoạt tính protease của tất cả các nghiệm thức đều giảm so với 0 ngày, trong đó nghiệm thức 10 cho hoạt tính cao nhất

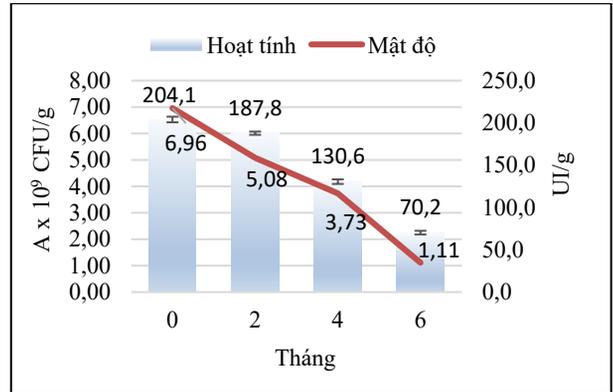
(126,17±1,09 UI/g) và có sự khác biệt có ý nghĩa về mật thông kê với các nghiệm thức còn lại cùng với sự duy trì hoạt tính lên đến 89,1%. Các nghiệm thức NT4, NT5, NT6, NT7, NT8 vẫn có hoạt tính thấp nhất và hiệu quả duy trì hoạt tính thấp hơn các nghiệm thức khác, tuy nhiên đến NT9 thì hoạt tính cao hơn (72,66 ±1,15 UI/g) và mức duy trì gần như cao nhất (88,4%) chỉ thấp hơn NT10.

Các nghiệm thức NT1, NT2, NT3 có mật số giảm dần tương ứng hoạt tính protease cũng giảm dần ở các nghiệm thức này. Các nghiệm thức NT4, NT5, NT6, NT7, NT8, NT9 có mật số là tương đương nhau, nhưng hoạt tính protease có sự khác nhau giữa các nghiệm thức này. Nghiệm thức NT10 (cả ba chủng) có mật số cao nhất tương ứng hoạt tính protease cũng là cao nhất. Các nghiệm thức NT11, NT12, NT13 có mật số tương đương nhau và cao hơn các nghiệm thức NT1, NT2, NT3, nhưng hoạt tính protease của sáu nghiệm thức này tương đương nhau. Kết quả cho thấy mật số vi khuẩn ít ảnh hưởng đến hoạt tính protease sinh ra. Khi thay đổi tỷ lệ các chủng vi khuẩn, mật số tế bào và hoạt tính protease không ổn định. Vì vậy, tỷ lệ các chủng phải phù hợp thì mới có thể duy trì mật số và hoạt tính protease (Nguyen et al., 2016).

Dựa vào kết quả mật số và hoạt tính protease của các nghiệm thức ta có thể xác định được tỷ lệ phối trộn của các chủng *Bacillus* spp. là 1:1:1 trong chất mang là 95% cám gạo + 5% ri đường. Điều này phù hợp với nghiên cứu của Pham et al. (2013) và Nguyen et al. (2016).

3.3. Khảo sát mật số vi sinh và hoạt tính protease của chế phẩm vi sinh theo thời gian bảo quản

Sau khi xác định được loại chất mang (95% cám gạo + 5% ri đường) và tỷ lệ phối trộn các chủng *Bacillus* spp. thích hợp (1:1:1) tiến hành tạo chế phẩm với 30 thử nghiệm. Tại các mốc thời gian 0, 2, 4, 6 tháng bảo quản ở nhiệt độ phòng 28±2°C, mẫu được kiểm tra mật số vi sinh vật và hoạt tính protease. Kết quả nghiên cứu được thể hiện qua Hình 2. Nhìn chung, ở nghiệm thức có mật số vi sinh cao tương ứng với giá trị hoạt tính lớn. Ở nghiệm thức có mật số thấp hơn thì có giá trị hoạt tính protease nhỏ hơn.

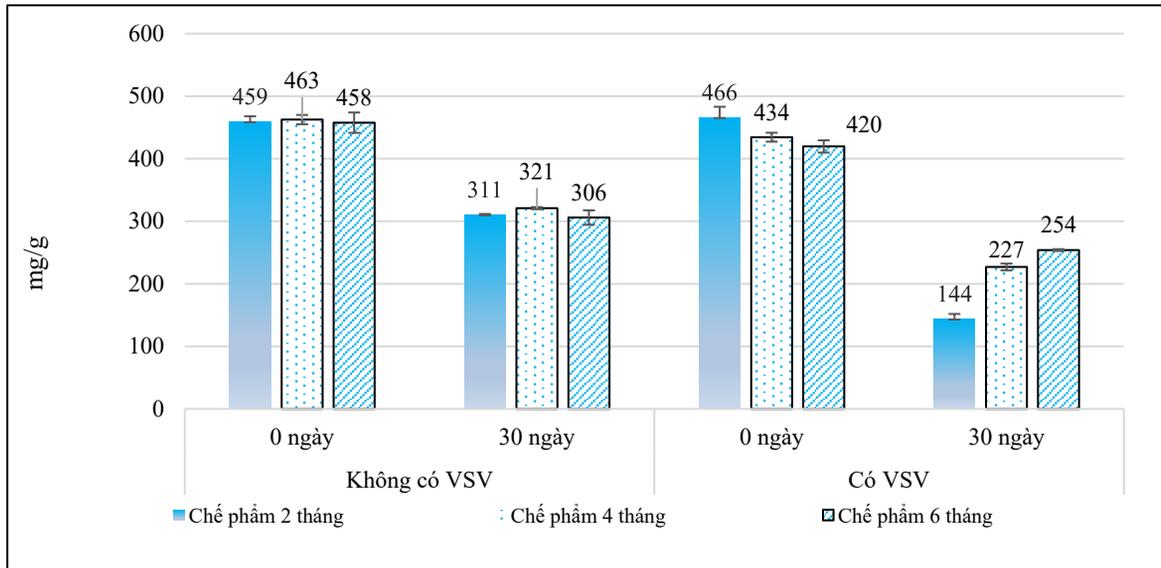


Hình 2. Mật số vi sinh và hoạt tính protease của chế phẩm theo thời gian

Sau 2 tháng bảo quản, mật số vi sinh và hoạt tính protease bị giảm nhẹ từ 6,96±0,02 × 10⁹ CFU/g và 204,1±3,3 UI/g xuống còn 5,08±0,01 × 10⁹ CFU/g và 187,8±1,9 UI/g. Sau 4 tháng bảo quản, mật số và hoạt tính protease còn 3,73±0,02 × 10⁹ CFU/g và 130,6±2,7 UI/g. Chế phẩm được bảo quản sau 2 tháng và 4 tháng có mật số và hoạt tính protease chỉ giảm nhẹ là do vi sinh vật đã thích nghi, sử dụng nguồn dinh dưỡng có trong chất mang để duy trì mật số. Sau 6 tháng bảo quản, mật số và hoạt tính của chế phẩm giảm mạnh chỉ còn 1,11±0,005 × 10⁹ CFU/g và 70,2 UI/g. Có thể là do nguồn dinh dưỡng có trong chất mang giảm dần theo thời gian bảo quản, độ ẩm của chất mang cũng giảm dần dẫn đến mật số giảm từ đó hoạt tính giảm theo. Kết quả nghiên cứu này tốt hơn nghiên cứu của Nguyen et al. (2016), khi cho thấy chế phẩm chỉ duy trì được mật số tối thiểu của sản phẩm chế phẩm vi sinh theo tiêu chuẩn của TCVN sau 3 tháng bảo quản. Kết quả nghiên cứu của An et al. (2017) cho thấy hỗn hợp chất mang gồm talc, cám gạo và trấu giúp hỗn hợp vi khuẩn *Bacillus* spp. sau 6 tháng duy trì mật số 10⁶ CFU/g. Trên hết, ở tất cả các thời điểm khảo sát trên đều cho mật số lớn hơn 10⁸ CFU/g, phù hợp sử dụng làm chế phẩm vi sinh theo tiêu chuẩn của TCVN 6168:2002.

3.4. Khảo sát khả năng phân hủy protein từ phế phẩm thủy sản

Chế phẩm được tạo ra với tỷ lệ chất mang và tỷ lệ vi sinh đã chọn. Tại các thời điểm bảo quản là 2 tháng, 4 tháng và 6 tháng, chế phẩm được đánh giá khả năng phân giải protein trong phụ phẩm thủy sản. Kết quả được thể hiện trong Hình 3.



Hình 3. Hàm lượng protein còn lại trong mẫu trước và sau 30 ngày ủ

Từ kết quả Hình 3, hàm lượng protein còn lại trong mẫu xử lý bởi chế phẩm vi sinh sau 2 tháng, 4 tháng và 6 tháng bảo quản cho thấy thời gian bảo quản càng dài thì hoạt tính enzyme giảm dần nên khả năng phân hủy protein giảm dần. Tại thời điểm 2 tháng bảo quản, chế phẩm vi sinh có khả năng phân hủy các protein là cao nhất nên hàm lượng protein còn lại trong mẫu chỉ có 144 mg/g chiếm 46,3% so với thời điểm trước khi bổ sung chế phẩm để tiến hành ủ 30 ngày thấp hơn rất nhiều so với mẫu đối chứng không bổ sung chế phẩm là 311 mg/g chiếm 67,6% so với thời điểm trước khi bắt đầu quá trình ủ 30 ngày. Đến thời điểm 4 tháng bảo quản, hoạt độ protease trong mẫu giảm nên hàm lượng protein chưa bị phân giải cao hơn 227 mg/g chiếm khoảng 52,3% hàm lượng protein có trong mẫu trước khi bổ sung chế phẩm. Sau 6 tháng bảo quản, hàm lượng protein còn lại trong mẫu sau khi ủ 30 ngày là cao nhất tại ba thời gian khảo sát, 254 mg/g chiếm 60,5% lượng protein ban đầu. Khi mật số và hoạt tính của chế phẩm giảm thì khả năng phân cắt protein cũng sẽ giảm dần đến lượng protein còn lại trong mẫu ngày càng cao. Bên cạnh đó, mùi ở các mẫu có bổ sung chế phẩm vi sinh dễ chịu hơn mẫu không bổ sung. Điều này giúp giảm ô nhiễm môi trường không khí trong quá trình xử lý phế phụ phẩm thủy sản. Tuy nhiên, chế phẩm vi sinh chưa được sử dụng để ủ phế phẩm cá trong nghiên cứu

nào, nhưng enzyme tinh khiết, như alcalase và flavourzyme đã được sử dụng trong nhiều nghiên cứu, sau 26 giờ hiệu suất thủy phân đạt 39,7% (Truong & Le, 2020). Kết quả nghiên cứu hiện tại giúp mở rộng hướng xử lý phế phẩm nhiều protein bằng công nghệ vi sinh với chi phí rẻ hơn và định hướng sản xuất các sản phẩm ly giải protein ứng dụng trong nông nghiệp an toàn hơn.

4. KẾT LUẬN

Tỷ lệ chất mang thích hợp nhất là 95% cám gạo và 5% ri đường và tỷ lệ phối trộn ba giống T36, T24 và T17 là 1:1:1 phù hợp nhất để tạo ra chế phẩm vi sinh. Mật số vi sinh ban đầu đạt $4,8 \times 10^9$ CFU/g, duy trì 92,1% sau 30 ngày bảo quản; hoạt tính ban đầu đạt 126,2 UI/g, duy trì 89,1% sau 30 ngày bảo quản. Sau 2, 4 và 6 tháng bảo quản, mật số vi sinh và hoạt tính protease tổng trong chế phẩm giảm dần. Với mật số ban đầu là $6,96 \times 10^9$ CFU/g và hoạt tính ban đầu là 204,1 UI/g, sau 6 tháng bảo quản còn lại lần lượt là $1,11 \times 10^9$ CFU/g và 70,2 UI/g. Mật số này thỏa tiêu chí về vi sinh vật trong chế phẩm vi sinh của TCVN. Tỷ lệ thủy phân phụ phẩm cá của chế phẩm thử nghiệm sau 2, 4 và 6 tháng bảo quản lần lượt là 53,7%, 47,7% và 39,5%. Thời gian bảo quản của chế phẩm trong 6 tháng vẫn duy trì hoạt tính sinh học và hiệu quả phân giải protein.

TÀI LIỆU THAM KHẢO (REFERENCES)

- Anson, M. L. (1938). The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *Journal of Physiology*, 22, 79–89. <https://doi.org/10.1085/jgp.22.1.79>
- Vajihah, D., Zohreh, H. E., & Morteza, K. A. (2024). Improvement of the valuable compounds of fish waste through solid-state fermentation with probiotics. *Applied Food Research*, 4(2), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2024.100534>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248–254.
- Boominadhan, U., Rajakumar, R., Sivakumar, P. K. V., & Joe, M. (2009). Chungbuk National University Optimization of Protease Enzyme Production Using *Bacillus* Sp. Isolated from Different Wastes. *Botany Research International*, 2(2), 83-87. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Bajaj, B. K., Sharma, N., Singh, S. (2013). Enhanced production of fibrinolytic protease from *Bacillus cereus* NS – 2 using cotton seed cake as nitrogen source. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2, 204–209. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.04.003>
- Dias, D. R., Vilela, D. M., Silvestre, M. P. C., & Schwan, R. R. (2008). Alkaline protease from *Bacillus* sp. isolated from coffee bean grown on cheese whey. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 2027–2034. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9706-6>
- Dang, A. H., Nguyen, O. T. P., & Nguyen, K. D. (2017). Selection of carrier materials for the antagonistic *Bacillus aerophilus* against rice bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Can Tho University Journal of Science*, 52, 8–15 (in Vietnamese). <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2017.118>
- Dang, H. A., Nguyen, D. K., Le, N. X. T. (2019). Selection of carrier materials for formulation of the antagonistic *Bacillus* spp. against rice bacterial leaf blight. *Can Tho University Journal of Science*, 11(3), 19–27 (in Vietnamese). <https://doi.org/10.22144/ctu.jen.2019.034>
- Doan, T. T. N., & Doan, T. T. K. (2023). Isolation, screening and survey of culture conditions of Protease-producing bacteria from poultry slaughterhouses in Tien Giang. *Ho Chi Minh city University of Education Journal of Science*, 20(10) (in Vietnamese), 1696-1706. [10.54607/hcmue.js.20.10.3931\(2023\)](https://doi.org/10.54607/hcmue.js.20.10.3931(2023))
- Hassan, M. A., Haroun, B. M., Amara, A. A., & Serour, E. A. (2013). Production and Characterization of Keratinolytic Protease from New Wool-Degrading *Bacillus* Species Isolated from Egyptian Ecosystem. *BioMed Research International*, 2013, 14. <https://doi.org/10.1155/2013/175012>
- Gabriela, P., Greice, C. R., Alexandre, J. C., Leila, Q. Z., Eduardo, J. L., Juliano, S. B., Roger, W., & Cristiano, R. M. (2019). Study of viability and storage stability of *Lactobacillus acidophilus* when encapsulated with the prebiotics rice bran, inulin and Hi-maize. *Food Hydrocolloids*, 95, 238-244. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.04.049>
- Kexin, R., Qiang W., Mengkai, H., Yan, C., Rufan, X., Jiajia, Y., Meijuan, X., Xian, Z. (2022). Research Progress on the Effect of Autolysis to *Bacillus subtilis* Fermentation Bioprocess. *Fermentation* 2022, 8(12), 685. <https://doi.org/10.3390/fermentation8120685>
- Kaur, R., Kaur, S., Dwibedi, V., Kaur, C., Akhtar, N., & Alzahrani, A. (2023). Development and characterization of rice bran-gum Arabic based encapsulated biofertilizer for enhanced shelf life and controlled bacterial release. *Front. Microbiol*, 14, 1267730. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1267730>
- Liu, R. L., Huang, C. L., & Feng, H. (2015). Salt stress represses production of extracellular protease in *Bacillus pumilus*. *Genetics and Molecular Research*, 14(2), 4939–4948. <http://dx.doi.org/10.4238/2015.May.11.27>
- Le, Y. T. H., & Nguyen, H. D. (2016). Evaluation of the probiotic properties of *Bacillus subtilis* strains isolated from the Mekong Delta. *Can Tho University Journal of Science, (Agriculture)* 26–32 (in Vietnamese). <https://doi.org/10.22144/ctu.jsi.2016.040>
- Maragkoudakis, P. A., Zoumpoulou, G., Miarisa C., Kalantzopoulou, G., Potb, B., & Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16, 189–199. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.02.009>
- Nguyen, P. V., & Phan, T. T. P. (2014). Isolating, identifying and determining the beneficial properties of *Bacillus* spp. strains from shrimp ponds in Ben Tre province. *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, 4, 94–102 (in Vietnamese).
- Nguyen, P. T. M., Vo, B. H., Tran, N. T., & Do, H. H. (2015). Preparation of protein isolated from rice bran. *Academia Journal of Biology*, 37(4), 479 – 486 (in Vietnamese). <https://doi.org/10.15625/0866-7160/v37n4.7091>

- Nguyen, N. T. H., Nguyen, H. L., Tran, H. K., Nguyen, T. K. B., Luong, T. H. (2016). Study on the production of microbial inoculants for treating solid waste from cassava starch processing to produce bio-organic fertilizer. *VNU Journal of Science: Earth and Environmental Sciences*, 32(1S), 282–288 (in Vietnamese).
- Pham, T. N., Le, T. T. T., Le, L. T. M., & Le, K. N. (2013). Research on production of microbial preparations to treat postharvest agricultural by-products. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 24, 58–62 (in Vietnamese).
- Shikha, Sharran, A., & Darmwal, N. S. (2007). Improved production of alkaline protease from a mutant of alkalophilic *Bacillus pantotheneticus* using molasses as a substrate. *Bioresource Technology*, 98, 881–885. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.03.023>
- Singh, P., Rani, A., & Chaudhary, N. (2015). Isolation and characterization of protease producing *Bacillus* sp from soil. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 6, 633–639.
- Singh, S., & Bajaj, B. K. (2016). Bioprocess optimization for production of thermoalkali-stable protease from *Bacillus subtilis* K-1 under solid-state fermentation. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 46(7), 717–724. <https://doi.org/10.1080/10826068.2015.1135455>
- Singh, S., & Bajaj, B. K. (2017). Agroindustrial/Forestry Residues as Substrates for Production of Thermoactive Alkaline Protease from *Bacillus licheniformis* K-3 Having Multifaceted Hydrolytic Potential. *Waste and Biomass Valor*, 8(2), 453–462. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9577-2>
- Tran, N. T. H., Le, H. T., Truong, B. Q., & Truong, H. P. T. (2012). Investigation of the application of protease enzyme from bacteria *Bacillus subtilis* for the hydrolysis of Pangasius by-products. *Journal of Agricultural and Forestry Science and Technology – Nong Lam University, Ho Chi Minh City*, 3/2012 (in Vietnamese).
- Tran, T. L., Phan, T. N. T., & Nguyen, D. T. A. (2023). Studying Production of Protein Hydrolysates from Fish By-Products using *Bacillus* sp. *Research Journal of Biotechnology*, 18(8), 1–10 (in Vietnamese). <https://doi.org/10.25303/1808rjbt01010>
- Truong T. M. T., & Le T. M. R. (2020). Hydrolysis for fish seasoning power product from Tracatfish flesh (*Pangasianodon hypophthalmus*) by using alcalase and flavourzyme enzyme mixture. *Can Tho Journal of Science*, 56(3B), 160-167 (in Vietnamese).
- Uyar, F., & Baysal, Z. (2004) Production and optimization of process parameters for alkaline protease production by a newly isolated *Bacillus* sp. under solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 39, 1893-1898. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.09.016>
- Ministry of Agriculture and Rural Development. (2010) *Promulgation of the Regulation on Production, Trading and Use of Fertilizers*. (Number 6/2010/TT-BNNPTNT) (in Vietnamese).
- Le, H. H. (2014). Fisheries Development in the Mekong Delta: Expansion of the Processing Industry. *Vietnam News Agency* (in Vietnamese). <https://bom.so/ZC1QTN>