

DOI:10.22144/ctu.jvn.2023.136

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN DÒNG VI KHUẨN LACTIC TRONG NEM CHUA THỊT CÓ TIỀM NĂNG ỨNG DỤNG LÀM VI KHUẨN GIỐNG TRONG SẢN XUẤT NEM CHUA

Dương Thị Hồng Nga*, Mai Thanh Hải, Lư Bảo Hân, Lý Thị Xuân Mai và Bùi Thị Quỳnh Hoa

Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Dương Thị Hồng Nga (email: ngab1900947@student.ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 05/12/2022

Ngày nhận bài sửa: 24/04/2023

Ngày duyệt đăng: 06/05/2023

Title:

Isolation and selection of lactic acid bacteria strains present in "nem chua thịt" for use as starter cultures

Từ khóa:

Nem chua, phân lập, tuyển chọn, vi khuẩn lactic

Keywords:

Isolation, selection, lactic acid bacteria, nem chua

ABSTRACT

This study was conducted to isolate, select and identify lactic acid bacteria (LAB), which has properties that can be used as a starter culture, from Vietnamese fermented pork sausage 'nem chua'. The results showed that 19 bacterial strains were isolated on MRS agar medium. Most colonies were round, having opalescent white color to milky white color, raised or flat elevation, lobulated or intact margin. Among 19 lactic acid bacterial strains isolated from 'Nem chua', there were 36.8% homofermentative strains and 63.2% heterofermentative strains. In the study of the ability to produce lactic acid and reduce pH, strain NTL2 and NTV2 were able to reduce pH faster than the others (3.65 and 3.7 respectively). They also produced the highest amount of lactic acid (19.13 mg/mL and 18.23 mg/mL) in MRS broth. Based on the typical properties of LAB, 12 strains were selected for identification by 16s rDNA sequence analysis, showing that: 6 strains are *Lacticaseibacillus rhamnosus*; 2 strains are *Lactobacillus casei*; 2 strains are *Lactiplantibacillus pentosus*, 1 strain is *Lactiplantibacillus argentoratensis* line, 1 strain was identified as *Lactobacillus saniviri* strain.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập, tuyển chọn và xác định dòng loại vi khuẩn axit lactic (LAB) từ nem chua của Việt Nam, loại vi khuẩn có các đặc tính phù hợp để sử dụng làm nguồn vi khuẩn giống. Mười chín dòng vi khuẩn lactic đã được phân lập trên môi trường MRS agar. Đa số khuẩn lạc có hình tròn, màu trắng đục, trắng ngà, nhô cao hoặc phẳng, mép phân thùy hoặc nguyên vẹn. Trong 19 dòng vi khuẩn phân lập từ nem chua, có 36,8% dòng lên men đồng hình, 63,2% dòng lên men dị hình. Thử nghiệm khả năng sinh axit lactic và làm giảm pH cho thấy NTL2, NTV2 có khả năng làm giảm pH nhanh hơn các dòng còn lại (lần lượt là 3,65 và 3,7), đồng thời cũng tạo ra lượng axit lactic cao nhất là 19,13 mg/mL và 18,23 mg/mL. Dựa vào các tính chất điển hình của vi khuẩn lactic, 12 dòng được chọn để định danh bằng phân tích trình tự 16s rDNA. kết quả cho thấy 6 dòng được xác định là dòng *Lacticaseibacillus rhamnosus*, 2 dòng là dòng *Lactobacillus casei*, 2 dòng là dòng *Lactiplantibacillus pentosus*, 1 dòng tương đồng với dòng *Lactiplantibacillus argentoratensis* và 1 dòng được xác định là dòng *Lactobacillus saniviri*.

1. GIỚI THIỆU

Nem chua là một món ăn truyền thống nổi tiếng ở nhiều địa phương ở Việt Nam, thường xuất hiện trong những bữa ăn quan trọng như: Tết, Lễ, Kỳ niệm,... cho đến những bữa cơm hằng ngày.

Thành phần chính của nó bao gồm thịt nạc xay mịn (55–60%), da lợn luộc, thái mỏng (30–35%), và phối trộn với các thành phần khác như gạo rang xay, đường, muối, gia vị sau đó tạo thành hình khối vuông hoặc hình trụ nhỏ, lá vòng hoặc lá chùm ruột thường được bao bên ngoài của các viên nem, sau đó viên nem được gói cẩn thận bằng lá chuối (Tran et al., 2011) giúp tạo môi trường yếm khí cho quá trình lên men và ức chế sự xâm nhập của các vi sinh vật có khả năng gây bệnh. Quá trình lên men sẽ diễn ra trong 2 đến 4 ngày ở nhiệt độ môi trường (30–33°C) (Nguyen, 2015).

Bản chất quá trình lên men trong nem chua là nhờ vào hoạt động trao đổi chất của nhóm vi khuẩn *Lactobacillus* (Ravys et al., 2012) và coagulase-negative cocci (CNC) (*Staphylococcus* và *Kocuria* spp.) (Sánchez et al., 2017). Dựa vào quá trình lên men axit lactic từ vi khuẩn có lợi với nhiều nguồn nguyên liệu, nem chua ngày càng được nhiều người ưa thích hơn bởi sự thơm ngon và vị chua đặc trưng của sản phẩm. Bên cạnh đó, thực phẩm lên men ngày càng được ưa chuộng vì cung cấp vi khuẩn lợi khuẩn sống cho hệ vi sinh đường ruột (Heller, 2001). Mặt khác, do không trải qua quá trình gia nhiệt nên phần lớn các chất dinh dưỡng trong thịt, đặc biệt là các vitamin, axit amin hoà tan không bị mất đi, đồng thời cũng hạn chế quá trình oxy hóa các axit béo tự do không bão hòa (Kołozyn-Krajewska & Dolatowski, 2012).

Tuy nhiên, do sử dụng hệ vi sinh vật từ nem cái (nem cái là nem thành phẩm có chất lượng tốt từ các mẻ sản xuất trước, được bảo quản để sử dụng như nguồn vi khuẩn giống cho các mẻ sản xuất sau) hoặc vi sinh vật tự nhiên từ lá vòng hoặc lá chùm ruột nên chất lượng nem chua thường không ổn định, nhất là nem chua được sản xuất với quy mô công nghiệp. Vì vậy, nghiên cứu phân lập, tuyển chọn các dòng vi khuẩn lactic từ nem chua truyền thống làm nguồn vi khuẩn giống thay thế hệ vi khuẩn trong nem cái giúp cải thiện và ổn định chất lượng của nem chua thành phẩm, đồng thời hạn chế vi khuẩn tạp nhiễm đảm bảo vệ sinh an toàn thực phẩm cho nem chua.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Nguồn vi sinh vật: Từ nhiều loại nem thành phẩm khác nhau nổi tiếng trên thị trường được mua

tại siêu thị Coopmart Cần Thơ (số 01 Hoà Bình, Phường Tân An, Quận Ninh Kiều, Thành phố Cần Thơ) bao gồm (1) nem chua sản xuất theo qui mô truyền thống, (2) nem chua sản xuất theo qui mô công nghiệp và nem chua thành phẩm của cơ sở sản xuất nem tại tỉnh Vĩnh Long.

Paste thịt có gia vị đã bổ sung “nem cái” nhưng chưa lên men và paste thịt chưa bổ sung “nem cái” được một cơ sở sản xuất nem ở tỉnh Vĩnh Long cung cấp và vận chuyển đến Vườn ươm Công nghệ Công nghiệp Việt Nam - Hàn Quốc ở nhiệt độ (2–4°C) trong khoảng 2 giờ.

Môi trường sử dụng: Plate Count Agar (PCA; Ấn Độ), de Man, Rogosa and Sharpe Agar (MRS Agar; Ấn Độ và Merck – Đức), de Man, Rogosa and Sharpe Broth (MRS Broth; Ấn Độ và Merck – Đức), Sabouraud có bổ sung 0,05(g/L) Chloramphenicol, LB (Luria - Bertani, Ấn Độ) Sodium chloride (NaCl, Trung Quốc), Sodium hydroxide (NaOH, Trung Quốc), Phenolphthalein (C₂₀H₁₄O₁₁, Trung Quốc).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Quy trình phân lập vi khuẩn lactic: Cân 10 g nem cho vào túi dập mẫu vô trùng có chứa 90 mL nước muối sinh lý 0,85%. Mẫu được đồng nhất khoảng 10 phút. Sau đó, 1 mL dung dịch được hút sau khi đồng nhất, tiến hành pha loãng ở nồng độ thích hợp. Tiếp theo, 0,1 mL dung dịch pha loãng được cho vào đĩa petri có chứa môi trường MRS agar + CaCO₃ (0,5%), dùng que cấy trang đều lên mặt môi trường và để khô tự nhiên. Các đĩa đã khô được đem vào tủ ú và lật ngược đĩa lại ú ở 37°C trong 48 giờ. Các khuẩn lạc mọc riêng lẻ được chọn, có khả năng phân giải CaCO₃ và có hình dạng màu sắc khác nhau đem tăng sinh trong môi trường MRS broth (ú 37°C, 24–48 giờ). Ria được cấy trên môi trường MRS agar + CaCO₃ (0,5%) theo đường zig zag để chọn các khuẩn lạc rời rạc. Những dòng vi khuẩn được chấp nhận có hình dạng trắng ngà hay trắng trong, bờ láng, lồi, bìa nguyên hoặc chia thùy.

Phương pháp chuẩn độ Therner: Khả năng sinh axit lactic mạnh hay yếu của các dòng vi khuẩn lactic được xác định bằng phương pháp chuẩn độ Therner; lấy 10 mL dịch nuôi lắc trong 1 giờ cho vào bình tam giác, bổ sung 20 mL nước cất và 1–2 giọt Phenolphthalein 1%. Chuẩn độ bằng NaOH 0,1 N đến khi xuất hiện màu hồng nhạt bền trong 30 giây thì dừng lại. Ghi lại thể tích NaOH đã dùng để chuẩn độ.

Phương pháp tuyển chọn: Xác định hình thái của dòng đã phân lập (dựa vào đặc điểm hình thái khuẩn lạc, đặc điểm hình thái tế bào, nhuộm Gram) và kiểm tra đặc tính sinh hóa (thử catalase, khả năng sinh axit, nhuộm bào tử và khả năng di động). Từ

đó, các dòng vi khuẩn lactic đã phân lập được xác định, tuyển chọn.

Phương pháp xác định kiểu lên men: Phương pháp xác định kiểu lên men lactic đồng hình và dị hình vào khả năng sinh khí CO₂ trong quá trình lên men glucose của vi khuẩn lactic. Cho chuông Durham vào ống nghiệm chứa 5 mL môi trường MRS, hấp khử trùng ở 121°C trong 15 phút; cấy dòng vi khuẩn lactic cần thử vào ống nghiệm, nuôi ở 37°C trong 48 giờ. Nếu trong chuông Durham có bọt khí thì chứng tỏ dòng vi khuẩn sinh khí CO₂ (lên men lactic dị hình); nếu trong chuông Durham không xuất hiện bọt khí thì chứng tỏ vi khuẩn không sinh khí CO₂ (lên men lactic đồng hình).

Phương pháp đo mật độ quang: Tiến hành tăng sinh các dòng vi khuẩn lactic trong các bình tam giác có chứa môi trường dinh dưỡng thích hợp ở điều kiện nuôi cấy tĩnh và nuôi ở nhiệt độ 37°C để vi khuẩn lactic sinh trưởng và phát triển trong môi trường dinh dưỡng. Các giống được nuôi tăng sinh trong môi trường MRS broth, tiến hành ly tâm lạnh thu sinh khối, sau đó tiến hành pha loãng phần sinh khối thu được bằng 2 mL nước muối 0,85% đã tiệt trùng; hút 1 mL tiến hành đo OD ở bước sóng 600 nm, để đạt được giá trị OD từ 0,5 đến 0,6. Để khảo sát khả năng sinh trưởng và phát triển của 19 dòng vi khuẩn lactic, trong quá trình nuôi cấy trong môi trường MRS broth sau mỗi 4 giờ, ta tiến hành lấy mẫu đo mật độ quang (OD) một lần ở bước sóng 600 nm trên máy UV-Vis.

Phương pháp nhận diện vi khuẩn bằng kỹ thuật sinh học phân tử: Chọn dòng LAB có hoạt tính tối ưu để định danh bằng phương pháp sinh học phân tử giải trình gen bằng 16S rRNA. DNA được tách chiết và thực hiện PCR với mồi đặc hiệu vùng 16s rRNA. Sau đó, trình tự được giải trực tiếp và so sánh với ngân hàng dữ liệu NCBI, từ đó xác định được chính xác loại vi khuẩn dựa trên tỉ lệ tương đồng của nó với ngân hàng dữ liệu NCBI. Quy trình được thực hiện tại Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

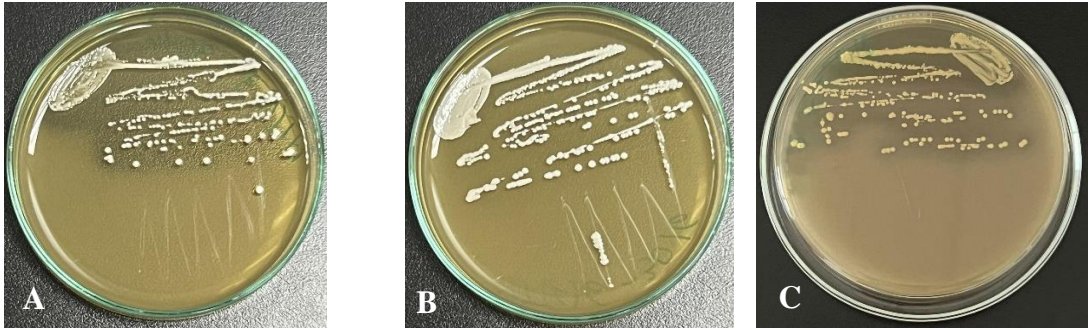
3.1. Kết quả phân lập vi khuẩn lactic từ sản phẩm nem chua

Từ các mẫu nem chua cơ sở, nem chua thị trường, 19 dòng vi khuẩn lactic được phân lập. Phần lớn các dòng vi khuẩn phân lập được có dạng khuẩn lạc hình tròn, màu trắng đục hoặc trắng ngà, bề mặt hơi lồi hoặc bằng phẳng. Đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa của vi khuẩn lactic được xác định thông qua các khảo sát một số đặc tính đặc trưng như nhuộm Gram, thử nghiệm catalase, khả năng di động của vi khuẩn. Kết quả thử nghiệm cho thấy, tất cả các dòng đều có Gram dương, không di động và thử nghiệm catalase âm tính. Kết quả tuyển chọn được 19 dòng thuộc nhóm vi khuẩn lactic dựa vào hình thái khuẩn lạc, hình dạng tế bào và các thử nghiệm sinh hóa (Bảng 1).

Bảng 1. Kết quả hình dạng, kích thước và màu sắc của khuẩn lạc quan sát bằng mắt

Dòng vi khuẩn	Hình thái khuẩn lạc	Hình dạng tế bào
NTL1	Tròn, trắng trong, bìa nguyên, bề mặt lồi	que ngắn, đầu tròn
NTL2	Tròn, trắng ngà, bìa nguyên, bề mặt hơi lồi	que ngắn, đầu tròn
NLT3	Tròn, trắng đục, bìa nguyên, bề mặt phẳng	que dài, đầu nhọn
NTL4	Tròn, trắng đục, bìa nguyên, bề mặt phẳng	que dài, xếp chuỗi
NTL5	Tròn, trắng đục, bìa nguyên, bề mặt hơi lồi	que ngắn, chuỗi dài
NTL6	Tròn, trắng đục bìa nguyên, bề mặt hơi lồi	que dài,
NTL7	Tròn, trắng ngà, bìa nguyên, bề mặt lồi	que dài
NTN1	Tròn, trắng đục, bìa nguyên, bề mặt hơi lồi	que dài
NTN2	Tròn, trắng đục, bìa nguyên, bề mặt phẳng	que dài
NT	Tròn, trắng đục, bìa nguyên, bề mặt phẳng	que dài
NT6	Tròn, trắng ngà, bìa nguyên, bề mặt hơi lồi	que dài, đầu tròn
NTC	Ovan, trắng ngà, bề mặt hơi lồi	que dài, đầu nhọn
NTG	Tròn, trắng đục, bìa nguyên, bề mặt bằng phẳng	que dài, đầu nhọn
NTV 1	Tròn, trắng ngà, bìa nguyên, bề mặt lồi	que ngắn, đầu tròn
NTV 2	Tròn, trắng ngà, bìa nguyên, bề mặt hơi lồi	que ngắn, đầu tròn
NTV 3	Tròn, trắng ngà, bìa nguyên, bề mặt phẳng	que ngắn, đầu tròn
NTV 4	Tròn, trắng đục, bìa nguyên, bề mặt hơi lồi	que dài, đầu tròn
NTV 5	Tròn, trắng đục, bìa nguyên, bề mặt lồi	que ngắn, đầu tròn
NTV 6	Tròn, trắng đục, bìa nguyên, bề mặt hơi lồi	que ngắn, đầu tròn

(-): Âm tính



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc của một số dòng vi khuẩn đại diện sau 2 ngày nuôi cấy trên môi trường MRS agar chứa 0,5% CaCO₃

A: dòng NTL3; B: dòng NTL6; C: dòng NTV6

Khả năng tạo vòng trong CaCO₃: 19 dòng vi khuẩn phân lập đều tạo vòng trong với CaCO₃. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của (Afoakwa et al., 2008). Lý do là trong quá trình phát triển của vi khuẩn đã tạo ra các chất biến dưỡng cùng với các sản phẩm của trao đổi chất, cụ thể là axit lactic và axit axetic. Các axit này tác dụng với CaCO₃ được bổ sung vào môi trường trong quá trình nuôi cấy, lượng CaCO₃ xung quanh khuẩn lạc bị chuyển hóa thành muối canxi, CO₂ và H₂O nhờ thế mà duy trì được pH ở mức 5,5-6, trả lại môi trường xung quanh khuẩn lạc trong như ban đầu. Bề dày vùng trong này biểu thị lượng axit sinh ra nhiều hay ít.



Hình 2. Dòng NTN1 tạo vòng phân giải CaCO₃ trên môi trường nuôi cấy MRS agar

3.2. Một vài đặc điểm sinh lý, sinh hóa

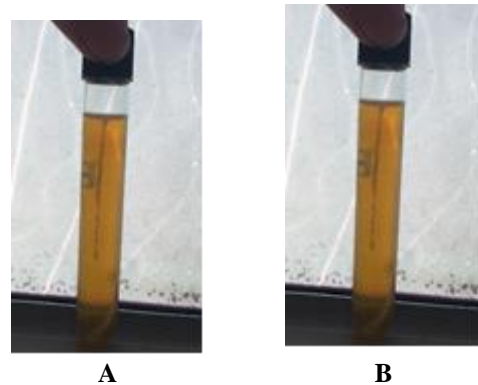
Sau khi phân lập vi khuẩn, một vài thí nghiệm sinh lý, sinh hóa đặc trưng được thực hiện như: nhuộm Gram, kiểm tra khả năng phân giải CaCO₃, thử nghiệm catalase và oxidase, khả năng di động, khả năng sinh bào tử và khả năng kháng axit.

Nhuộm Gram: Tất cả tế bào của 19 dòng vi khuẩn phân lập đều bắt màu tím xanh của phẩm nhuộm crystal violet (Hình 3), chứng tỏ các dòng vi khuẩn thuộc vi khuẩn Gram dương.



Hình 3. Mẫu nhuộm Gram của dòng vi khuẩn NTL4 (A), NT6 (B) ở độ phóng đại X100

Thử nghiệm catalase: Nhờ H₂O₂ 30% lên sinh khối tất cả 19 dòng vi khuẩn phân lập được đều không có hiện tượng sủi bọt khí nên các dòng vi khuẩn này không có enzyme catalase và cho ra kết quả âm tính.



Hình 4. Khả năng di động của dòng NTL1 (A) và NTG (B)

Thử nghiệm khả năng di động: 19 dòng vi khuẩn được nuôi cấy trong các ống nghiệm chứa môi trường thạch bán lỏng đặc theo phương thẳng đứng, ở 37°C trong 24 – 48 giờ. Kết quả cho thấy 19 dòng vi khuẩn phân lập được không có khả năng di động. Hình ảnh đại diện khả năng di động một số dòng vi khuẩn phân lập được trình bày ở Hình 4.

Khả năng sinh bào tử: Tất cả 19 dòng vi khuẩn đều bắt màu hồng của thuốc thử fuchsin chứng tỏ 19 dòng vi khuẩn kết quả âm tính.

Khả năng kháng axit: Tất cả 19 dòng vi khuẩn phân lập được đều bắt màu xanh của methylene blue nên cả 19 dòng vi khuẩn đều cho âm tính.

Tham chiếu với khóa phân loại của Sneath, có thể bước đầu khẳng định các dòng vi khuẩn này mang đặc điểm của chi *Lactobacillus*. Kết quả này phù hợp với những nghiên cứu trước đây về vi khuẩn lactic của Cullimore (2010), Hill & Ferrer (2021), Axelsson (2004). Các nghiên cứu đều chỉ ra *Lactobacillus* là một nhóm chính của vi khuẩn lactic, chúng mang những đặc điểm tế bào và đặc điểm sinh học đồng nhất nhau. Chúng rất phổ biến trong tự nhiên và được coi là an toàn cho con người, ngay trong cơ thể người cũng có sự hiện diện của vi khuẩn. *Lactobacillus* được sử dụng để sản xuất các chế phẩm công nghiệp như sữa chua, phô mai, rau củ muối chua, rượu bia và nhiều sản phẩm khác.

3.3. Kiểm tra khả năng lên men của các dòng vi khuẩn lactic

Khả năng lên men của các dòng vi khuẩn lactic được kiểm tra trong môi trường MRS Broth có chuông Durham để xác định kiểu lên men của các dòng vi khuẩn thông qua việc sinh khí CO₂ có trong chuông Durham sau 2 ngày lên men (nếu có xuất hiện bọt khí trong chuông Durham là vi khuẩn lên men dị hình và ngược lại, nếu không xuất hiện bọt khí trong chuông Durham là vi khuẩn lên men đồng hình). Đồng thời, khả năng lên men của các dòng vi khuẩn được kiểm tra thông qua việc đo pH dịch trước và sau khi lên men. Kết quả từ 19 dòng vi khuẩn lactic phân lập từ các loại nem chua khác nhau có 36,8% dòng vi khuẩn lactic lên men đồng hình và 63,2% dòng vi khuẩn lactic lên men dị hình. Kết quả chi tiết được thể hiện ở Bảng 2.

Vi khuẩn lactic lên men đồng hình là loại vi khuẩn lactic chỉ tạo ra axit lactic như trong quá trình lên men. Mặt khác, vi khuẩn lactic lên men dị hình là loại vi khuẩn lactic tạo ra cả ethanol/axit axetic và CO₂, axit lactic dưới dạng sản phẩm phụ trong quá trình lên men glucose (Farnworth, 2008). Tuy nhiên, khác với thí nghiệm khảo sát khả năng sinh axit tối đa của vi khuẩn lactic, nội dung thí nghiệm này kiểm tra đặc điểm lên men đồng hình/dị hình của các dòng vi khuẩn lactic phân lập thông qua khả năng sinh khí CO₂. Thí nghiệm bố trí đo đạc trong thời gian 48 giờ, tốc độ phát triển và mật số vi khuẩn trong các

mẫu không giống nhau nên cũng ảnh hưởng đến pH của dịch sau lên men (Bảng 2 và 3) (dòng dị hình NTL5, OD_{600nm}:1,97 pH:4,39 < pH:5,66 dòng đồng hình NTL6, OD_{600nm}:0,62). Kết hợp dòng vi khuẩn lactic lên men đồng hình và lên men dị hình giúp sản phẩm lên men lactic tăng hương vị đặc trưng như sữa chua, phô mai...(Gänzle, 2015).

Bảng 2. Kết quả lên men đồng hình và dị hình

Mẫu	pH dịch sau lên men	Kiểu lên men	
		Đồng hình	Dị hình
NTL1	4,33	X	
NTL2	4,30		X
NTL3	4,36	X	
NTL4	4,37		X
NTL5	4,39		X
NTL6	5,66	X	
NTL7	4,33		X
NTN1	4,30	X	
NTN2	4,15	X	
NT	4,45	X	
NT6	5,29	X	
NTC	5,63		X
NTG	4,79		X
NTV1	4,58		X
NTV2	4,21		X
NTV3	4,32		X
NTV4	3,87		X
NTV5	4,36		X
NTV6	4,91		X

pH dịch trước lên men: 6,41

Kết quả Bảng 2 cho thấy pH của dịch trước khi lên men là 6,41 nằm trong khoảng pH tối ưu (5,5-6,5) cho sự phát triển của vi khuẩn lactic (Axelsson, 2004). Sau 48 giờ lên men, pH của cả 19 giống đều giảm xuống mức 3,87 – 5,66, chứng tỏ các dòng này đều sinh ra axit làm giảm pH của môi trường.

3.4. Xác định khả năng sinh axit lactic và làm giảm pH của LAB

Mười chín dòng LAB phân lập được thử nghiệm khả năng sinh axit lactic và làm giảm pH. Tất cả chúng được nuôi cấy trong môi trường MRS broth sử dụng glucose (20 g/L) làm nguồn carbon. Từ dung dịch MRS ở pH 6,41 ban đầu, sau 24 giờ nuôi cấy vi khuẩn lactic trong môi trường MRS broth, pH của dung dịch MRS broth đã giảm từ 6,41 xuống 5,38 ÷ 3,65. Hàm lượng axit sinh ra trong môi trường MRS broth (tính theo axit lactic, mg/mL) từ 11,92 đến 19,13 mg/mL. Kết quả chi tiết được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3. pH, hàm lượng axit lactic và giá trị OD_{600nm} tạo ra bởi LAB

Mẫu nem	pH	Axit lactic (mg/mL)	Giá trị OD _{600nm}
NTL1	4,16 ± 0,03 ^f	15,52 ± 0,015 ^e	1,659 ± 0,015 ^j
NTL2	3,65 ± 0,01 ^a	19,13 ± 0,015 ^a	1,948 ± 0,015 ^m
NTL3	4,29 ± 0,01 ^h	11,92 ± 0,030 ⁱ	1,399 ± 0,015 ^f
NTL4	4,04 ± 0,01 ^e	13,72 ± 0,015 ^g	1,793 ± 0,015 ^k
NTL5	3,74 ± 0,01 ^{cd}	17,32 ± 0,012 ^c	1,972 ± 0,015 ^m
NTL6	5,38 ± 0,015 ^p	12,82 ± 0,015 ^h	0,619 ± 0,015 ^b
NTL7	3,75 ± 0,01 ^d	17,32 ± 0,015 ^c	1,852 ± 0,015 ^l
NT	4,36 ± 0,026 ⁱ	15,53 ± 0,015 ^e	0,723 ± 0,015 ^d
NT6	5,05 ± 0,01 ⁿ	12,83 ± 0,015 ^h	0,683 ± 0,014 ^c
NTN1	4,61 ± 0,01 ^j	14,63 ± 0,015 ^f	0,867 ± 0,015 ^e
NTN2	4,53 ± 0,01 ^k	13,73 ± 0,010 ^g	1,644 ± 0,012 ⁱ
NTG	4,68 ± 0,01 ^l	12,83 ± 0,012 ^h	1,956 ± 0,015 ^m
NTC	4,74 ± 0,012 ^m	13,73 ± 0,015 ^g	0,864 ± 0,015 ^e
NTV1	4,17 ± 0,01 ^g	16,43 ± 0,015 ^d	1,630 ± 0,015 ^{hi}
NTV2	3,7 ± 0,014 ^b	18,23 ± 0,020 ^b	1,987 ± 0,015 ⁿ
NTV3	3,75 ± 0,026 ^d	15,53 ± 0,015 ^e	1,429 ± 0,015 ^g
NTV 4	4,27 ± 0,01 ^g	14,63 ± 0,015 ^f	1,616 ± 0,015 ^h
NTV5	3,73 ± 0,01 ^c	16,43 ± 0,015 ^d	2,015 ± 0,015 ^q
NTV6	5,24 ± 0,01 ^o	11,93 ± 0,001 ⁱ	0,157 ± 0,015 ^a

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5%.

Kết quả khảo sát cho thấy lượng axit sinh ra của 19 dòng vi khuẩn lactic thuộc loại trung bình (≤ 20 mg/mL). Trong đó, dòng NTL2, NTV2 có khả năng làm giảm pH nhanh nhất (lần lượt là 3,65 và 3,7), đồng thời cũng tạo ra lượng axit lactic cao nhất là 19,13 mg/mL và 18,23 mg/mL. Khả năng giảm pH nhanh và tạo nhiều axit lactic giúp cải thiện quá trình lên men, rút ngắn được thời gian sản xuất nem chua. Bên cạnh đó, việc giảm pH còn có hiệu quả khác trong sản phẩm thịt lên men.

Theo Buckenhüskes (1993), việc giảm pH còn giúp protein thịt đông tụ tạo cấu trúc vững chắc cho sản phẩm. Giá trị pH trong thực phẩm lên men cũng được xem là yếu tố quan trọng để kéo dài thời hạn sử dụng sản phẩm. Do đó, trong quá trình lên men thực phẩm điều quan trọng là giá trị pH phải giảm nhiều và nhanh.

So sánh với nghiên cứu của Doungkhwan et al. (2017) về giá trị pH và axit lactic của xúc xích thịt I-San (Thái Lan) cho thấy mẫu có giá trị pH thấp nhất là 4,35 với hàm lượng axit lactic là 11,7 g/L. Các nghiên cứu cho thấy 19 dòng phân lập được có khả năng sinh axit lactic cao hơn và pH sau lên men thấp hơn nên các dòng vi khuẩn này đều thích hợp cho việc ứng dụng lên men nem chua.

3.5. Nhận diện dòng vi khuẩn bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Từ 19 dòng vi khuẩn lactic phân lập từ các loại nem chua khác nhau, 12 dòng được chọn để định

danh dựa vào các tính chất điển hình của vi khuẩn lactic như thử tính catalase, nhuộm gram, bào tử, tính di động, sinh khối và dựa vào kiểu lên men lactic cho kết quả đồng hình, dị hình. Kết quả định danh theo phương pháp giải trình tự vùng gen 16S rRNA và so sánh kết quả trên ngân hàng gen NCBI bằng phần mềm Blast trên trang web NCBI (Bảng 4).

Từ kết quả Bảng 4, 11 dòng vi khuẩn có mức độ tương đồng về trình tự gen 16S rRNA trên 98% với các dòng vi khuẩn so sánh, cụ thể: 6 dòng NTL1, NTL3, NTL4, NTL5, NTV1, NTV6 có trên 98% tương đồng với dòng vi sinh vật *Lactocaseibacillus rhamnosus*; có 2 dòng tương đồng với dòng *Lactobacillus casei* là NT và NT6 với độ tương đồng là 99,84%; 2 dòng NTC và NTG tương đồng 100% với dòng *Lactiplantibacillus pentosus*, dòng NTN1 có 99,87% tương đồng với dòng *Lactiplantibacillus argentoratensis*. Trong khi đó, mẫu NTL6 tương đồng với dòng *Lactobacillus saniviri* ở mức độ 90,36%. Như vậy, 12 dòng vi sinh vật phân lập đã được nhận diện bằng kỹ thuật sinh học phân tử đều là thuộc vi khuẩn lactic. Nghiên cứu về hệ vi sinh vật hiện diện trong sản phẩm lên men cho thấy vi khuẩn sinh axit lactic chiếm ưu thế tăng nhanh trong suốt quá trình lên men.

Bảng 4. So sánh kết quả giải trình tự trên ngân hàng gen NCBI

Mẫu	Mã gen	Các dòng so sánh	Số base	Độ tương đồng	Loài xác định
NTL1	MN01393.1	<i>L.rhamnosus</i>	1445	100%	<i>L.rhamnosus</i>
NTL3	MN01393.1	<i>L.rhamnosus</i>	1445	98,65%	<i>L.rhamnosus</i>
NTL4	MN01393.1	<i>L.rhamnosus</i>	1445	99,55%	<i>L.rhamnosus</i>
NTL5	MN01393.1	<i>L.rhamnosus</i>	1445	100%	<i>L.rhamnosus</i>
NTL6	MH488729.1	<i>L.saniviri</i>	830	90,39 %	<i>L.saniviri</i>
NT	JN974257.1	<i>L.casei</i>	831	99,84%	<i>L.casei</i>
NT6	JN974257.1	<i>L.casei</i>	831	99,84%	<i>L.casei</i>
NTN1	ON797047.1	<i>L.argenteratensis</i>	1489	99,87%	<i>L.argenteratensis</i>
NTV1	MN01393.1	<i>L.rhamnosus</i>	1445	100%	<i>L.rhamnosus</i>
NTV6	MN01393.1	<i>L.rhamnosus</i>	1445	99%	<i>L.rhamnosus</i>
NTC	ON838100.1	<i>L.pentosus</i>	1470	100%	<i>L.pentosus</i>
NTG	CP099558.1	<i>L.pentosus</i>	3548025	100%	<i>L.pentosus</i>

L.rhamnosus và *L.casei* là hai loài có khả năng tạo axit lactic tốt, từ lâu đã được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm (Heller, 2001). Công dụng của chúng không chỉ giúp tạo ra chế phẩm sinh học, mà còn là chất bảo vệ các sản phẩm sữa lên men và không lên men, đồ uống, thực phẩm ăn liền, xúc xích và trong món salad. Bên cạnh đó, *L.rhamnosus* và *L.casei* có khả năng chống chịu các điều kiện cực đoan ở hệ tiêu hóa như: pH thấp ở dạ dày, chống chịu muối mật cũng như có khả năng kháng các vi khuẩn gây bệnh đường ruột nên chúng được sử dụng như probiotic quan trọng, có tác dụng ngăn chặn và điều trị những bệnh về tiêu chảy và nhiễm khuẩn đường tiêu hóa (Szajewska & Hojsak, 2020; Pimentel et al., 2021).

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập được 19 dòng vi khuẩn trên môi trường MRS agar và tất cả đều là vi khuẩn axit lactic. Các dòng vi khuẩn này đều có khả năng lên men trong môi trường MRS broth và sinh axit lactic. Từ 19 dòng này, 12 dòng được xác định là *Lactobacillus*, bao gồm 6 dòng *L.rhamnosus*, 2 dòng *L.casei*, 2 dòng *L.pentosus* và 1 dòng *L.argenteratensis*. Vi khuẩn *Lactobacillus* có khả năng giữ hương vị truyền thống của sản phẩm, cung cấp nguồn vi khuẩn lợi khuẩn và đặc biệt kháng vi khuẩn gây bệnh, đóng góp cho an toàn của sản phẩm không qua chế biến nhiệt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., & Ryan, A. (2008). Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(9), 840–857. <https://doi.org/10.1080/10408390701719272>

Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects, Third Edition: Revised and Expanded*. <https://doi.org/10.1201/9780824752033.ch1>

Buckenhüskes, H. J. (1993). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiology Reviews*, 12(1–3), 253-271. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1993.tb00022.x>

Cullimore, D. R. (2010). Practical Atlas for Bacterial Identification. In *Practical Atlas for Bacterial Identification*. <https://doi.org/10.1201/9781420087987>

Doungkwan, P., Tavitchasri, P., Laosinwattana, C., Ngamyeesoon, N., & Pilasombut, K. (2017). Comparison of fermentation process in Thai fermented pork sausage (I-San sausage) on quality and safety. *International Journal of Agricultural Technology*, 13(7), 2205–2217.

Farnworth, E. R. (2008). Handbook of fermented functional foods. In *Handbook of Fermented Functional Foods, Second Edition*. <https://doi.org/10.1201/9781420053289>

Gänzle, M. G. (2015). Lactic metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. In *Current Opinion in Food Science* (Vol. 2), 106 -117. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.03.001>

Heller, K. J. (2001). Probiotic bacteria in fermented foods: Product characteristics and starter organisms. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2 SUPPL.), 374-379. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.374s>

Hill, A., & Ferrer, M. A. (2021). *Classification of Lactic Acid Cultures*. Cheese Making Technology (e-Book).

Kolozyn-Krajewska, D., & Dolatowski, Z. J. (2012). Probiotic meat products and human nutrition.

- Process Biochemistry*, 47(12), 1761- 1772.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.09.017>
- Nguyen, L. A. (2015). *Health-promoting microbes in traditional Vietnamese fermented foods: A review. Food Science and Human Wellness*, 4(4), 147–161.
<https://doi.org/10.1016/j.fshw.2015.08.004>
- Pimentel, T. C., Brandão, L. R., de Oliveira, M. P., da Costa, W. K. A., & Magnani, M. (2021). Health benefits and technological effects of *Lactocaseibacillus casei*-01: An overview of the scientific literature. *Trends in Food Science & Technology*, 114, 722–737.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.030>
- Ravyts, F., Vuyst, L. De, & Leroy, F. (2012). Bacterial diversity and functionalities in food fermentations. *Engineering in Life Sciences*, 12(4), 356–367.
<https://doi.org/10.1002/elsc.201100119>
- Sánchez Mainar, M., Stavropoulou, D. A., & Leroy, F. (2017). Exploring the metabolic heterogeneity of coagulase-negative staphylococci to improve the quality and safety of fermented meats: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 247, 24-37.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.021>
- Sneath, P. H. A., Bergey, D. H., & Holt, J. G. (1986). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Issue 1-2). Williams & Wilkins.
<https://books.google.com.vn/books?id=DQL1RAAACA AJ>
- Szajewska, H., & Hojsak, I. (2020). Health benefits of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subspecies *lactis* BB-12 in children. In *Postgraduate Medicine* (Vol. 132, Issue 5).
<https://doi.org/10.1080/00325481.2020.1731214>
- Tran, K. T. M., May, B. K., Smooker, P. M., Van, T. T. H., & Coloe, P. J. (2011). Distribution and genetic diversity of lactic acid bacteria from traditional fermented sausage. *Food Research International*, 44(1), 338-344.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.010>