

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN LACTIC CHỊU NHIỆT TỪ PHỤ PHẨM NÔNG NGHIỆP

• Bùi Hoàng Đăng Long^(*), Huỳnh Xuân Phong^(*),
Nguyễn Ngọc Thạnh^(*), Ngô Thị Phương Dung^(*)

Tóm tắt

*Nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát khả năng chịu nhiệt, kháng khuẩn và lên men của các chủng vi khuẩn lactic phân lập từ các mẫu phụ phẩm nông nghiệp ở các tỉnh vùng Đồng bằng sông Cửu Long và Bình Dương. Kết quả đã phân lập được 36 chủng vi khuẩn lactic với các đặc tính sinh hoá phù hợp. Trong đó, 8/36 chủng có khả năng phát triển ở nhiệt độ đến 47°C. Tổng số 29/36 chủng vi khuẩn có khả năng kháng chủng vi khuẩn chỉ thị *Bacillus subtilis*, trong đó 5 chủng (ND3, ND1, ND4, CT1, BA4) tạo đường kính vòng kháng khuẩn đạt trên 10 mm. Trong 10 chủng được khảo sát lên men axit, chủng CC2 có khả năng lên men dung dịch sucrose 4% (w/v) sinh axit tổng cao nhất ở 38°C trong 5 ngày, đạt 1,425 g/L.*

Từ khóa: Chịu nhiệt, kháng khuẩn, lên men lactic, phụ phẩm nông nghiệp, vi khuẩn lactic.

1. Đặt vấn đề

Ngày nay, axit lactic được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau như bảo quản và chế biến thực phẩm, trong y học, môi trường. Trong ngành công nghiệp nhẹ, axit lactic là tiền chất sản xuất polymer tự huỷ sinh học [8]. Trong y học và dược học, axit lactic và các nhóm chức có tính tương thích sinh học, là thành phần điều chế các nhóm dược phẩm thiết yếu [1]. Polymer tổng hợp bởi axit lactic đóng vai trò quan trọng trong công nghiệp nhờ các tính chất vật liệu, sinh lý và sinh hoá ưu việt [10].

Quá trình lên men axit lactic mang lại hiệu quả tốt hơn tổng hợp công nghiệp. Axit lactic được sản xuất từ nhiều nguồn nguyên liệu khác nhau. Trong công nghiệp, váng sữa và rỉ đường là hai nguồn phụ phẩm được nghiên cứu lên men axit lactic do chứa hàm lượng đường cao và các chất dinh dưỡng còn lại [6]. Axit lactic dùng làm nguyên liệu trong công nghệ lên men nhằm hạ giá thành sản phẩm, thật sự có ý nghĩa không chỉ về mặt kinh tế mà còn trong đời sống [7].

Trong thời kỳ cách mạng công nghiệp, quá trình lên men axit lactic diễn ra không chỉ ở quy mô thủ công mà ngày càng mở rộng theo xu hướng gắn với công nghiệp, trong các hệ thống lên men quy mô lớn. Điều kiện lên men quy mô lớn trong các hệ thống lên men gặp nhiều trở ngại chủ yếu ở nhiệt lượng sinh ra làm tăng nhiệt độ lên men, gây ức chế vi sinh vật. Do đó, các nhà máy sản xuất đã

tốn kém nhiều chi phí xây dựng các hệ thống làm mát vốn có hiệu quả hạn chế nhưng tốn kém nhiều năng lượng. Từ thực tế cho thấy, việc phân lập các chủng vi khuẩn lactic chịu nhiệt độ cao có tiềm năng rất lớn trong việc đáp ứng với nhiệt lượng sinh ra trong lên men công nghiệp. Từ đó, có thể làm giảm chi phí sản xuất và năng lượng tiêu tốn và phục vụ phát triển bền vững.

Việt Nam có điều kiện khí hậu, tự nhiên thích hợp cho nền nông nghiệp phát triển. Hằng năm, hàng trăm triệu tấn phụ phẩm, phế thải như rơm rạ, bã mía, vỏ trái cây được thải ra môi trường. Đây là nguồn phân lập vi sinh vật có tiềm năng khai thác phục vụ công nghệ lên men. Theo thống kê, phụ phẩm nông nghiệp chiếm 65% tổng lượng rác thải rắn nông thôn [11].

Việc sử dụng phế liệu, phế thải trong sản xuất nông nghiệp đối với nước ta còn manh mún và tự phát. Cùng sự phát triển của nền nông nghiệp phát triển theo hướng tập trung, nghiên cứu này thực hiện nhằm mục tiêu phân lập và tuyển chọn được một số vi khuẩn có khả năng lên men lactic từ phụ phẩm nông nghiệp tại thành phố Cần Thơ, Vĩnh Long, Bến Tre, An Giang, Bình Dương và Đồng Tháp nhằm tuyển chọn chủng vi khuẩn chịu nhiệt có khả năng lên men lactic và kháng khuẩn tốt giúp mở ra tiềm năng ứng dụng vào sản xuất thực phẩm và công nghiệp.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Nguyên vật liệu: Nguồn mẫu dùng để phân lập: lõi bắp, vỏ bắp, bắp cải, vỏ trái cây (xoài, dứa,

^(*) Trường Đại học Cần Thơ.

nhân, chôm chôm, cóc, vái, bòn bon...) thu thập tại thành phố Cần Thơ, Vĩnh Long, Bến Tre, An Giang, Bình Dương, Đồng Tháp. Vi khuẩn chỉ thị *Bacillus subtilis* được lưu trữ tại Phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học Thực phẩm, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.

Môi trường MRS (De Man, Rogosa and Sharpe) gồm: peptone (10,0 g/L), meat extract (8,0 g/L), yeast extract (4,0 g/L), D-glucose (20,0 g/L), di-potassium hydrogen phosphate (2,0 g/L), Tween 80 (1,0 g/L), di-ammonium hydrogen citrate (2,0 g/L), sodium acetate (5,0 g/L), magnesium sulfate (0,2 g/L) và manganese sulfate (0,04 g/L) [3].

Hoá chất phân tích: nhuộm Gram (crystal violet, dung dịch iod, dung dịch khử màu, fushin). Thuốc thử catalase (hydrogen peoxide 3%), oxidase.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập các chủng vi khuẩn lactic từ phụ phẩm nông nghiệp

Mẫu thu từ các địa điểm được mang về phòng thí nghiệm, cắt nhỏ, sau đó lấy 2 g cho vào tăng sinh trong 50 mL môi trường MRS broth, ủ lắc 180 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ. Pha loãng mẫu 10, 100, 1.000 và 10.000 lần với dịch muối sinh lý (0,85% w/v), sau đó cấy trải dịch pha loãng trên môi trường thạch MRS và ủ lật úp đĩa trong 48 giờ ở 37°C. Sau 48 giờ, chọn những khuẩn lạc tiêu biểu tiến hành cấy chuyển nhiều lần trên môi trường thạch MRS đến khi đạt đến tế bào vi khuẩn thuần được quan sát dưới kính hiển vi quang học.

2.2.2. Định danh sơ bộ các chủng vi khuẩn phân lập

Các chủng vi khuẩn thuần được tiến hành kiểm tra đặc điểm hình thái khuẩn lạc, tế bào, nhuộm Gram, thử catalase, thử oxidase, nhuộm bào tử, kiểm tra khả năng sinh axit lactic (thuốc thử Uferment), để xác định các chủng vi khuẩn phân lập được thuộc nhóm vi khuẩn lactic.

2.2.3. Sơ tuyển các chủng vi khuẩn có khả năng sinh axit lactic

Tăng sinh các chủng vi khuẩn trong môi trường MRS broth (24 giờ, 37°C, lắc 180 vòng/phút). Nhỏ giọt dung dịch nuôi cấy lên giữa đĩa môi trường MRS agar có bổ sung bromocresol purple (0,01%) và CaCO₃ (0,05%) và ủ ở 37°C. Đo và so sánh vòng phân giải sinh ra xung quanh khuẩn lạc vi khuẩn sau 24 và 48 giờ. Chọn các chủng vi khuẩn

có khả năng sinh axit lactic mạnh.

2.2.4. Khảo sát khả năng chịu nhiệt của các chủng vi khuẩn lactic

Cấy ria các chủng vi khuẩn lactic thuần phân lập được từ thí nghiệm 1 vào các đĩa petri có chứa sẵn môi trường MRS agar. Sau 48 giờ ủ kỵ khí ở nhiệt độ lần lượt là 37, 39, 41, 43, 45 và 47°C. Quan sát và ghi nhận sự phát triển khuẩn lạc để chọn chủng vi khuẩn chịu nhiệt tốt.

2.2.5. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn và sinh bacteriocin

Tiến hành bằng phương pháp “well diffusion agar” (khuếch tán trên giếng thạch) [4]. Tăng sinh vi khuẩn chỉ thị *Bacillus subtilis* trong môi trường Nutrient broth (ủ lắc 180 vòng/phút, ở 35°C). Đồng thời, tăng sinh các chủng vi khuẩn lactic trong môi trường MRS broth.

Phương pháp “khuếch tán trên giếng thạch”: Phương pháp này dựa trên khả năng đối kháng của bacteriocin với vi khuẩn chỉ thị của vi khuẩn lactic trên môi trường nuôi cấy. Bacteriocin có khả năng khuếch tán trong môi trường agar và tác động lên vi khuẩn chỉ thị. Vi khuẩn lactic sinh bacteriocin kháng được vi khuẩn chỉ thị sẽ xuất hiện vòng vô khuẩn xung quanh giếng thạch.

Chuẩn bị môi trường chứa dòng chỉ thị: Dòng chỉ thị được nuôi cấy trên đĩa 24 giờ đến mật số 10⁹ tế bào/mL (bằng buồng đếm hồng cầu). Bơm 10% dung dịch vi khuẩn này vào môi trường nước mắm - peptone agar (nước mắm 35°N: 3% v/v, peptone 1% w/v, agar 2% w/v) đã làm nguội ở 50°C. Lắc nhẹ để trộn đều dung dịch trong môi trường chứa vi khuẩn, tiến hành đổ môi trường chứa vi khuẩn chỉ thị vào đĩa petri. Tạo giếng trên đĩa môi trường (đường kính 0,5 cm).

Chuẩn bị dịch chứa bacteriocin thô: Tăng sinh chủng vi khuẩn lactic trong môi trường MRS broth (ủ kỵ khí trong 48 giờ). Sau đó ly tâm dịch tăng sinh 8.000 vòng/phút, 15 phút ở 4°C. Thu dịch sau tăng sinh, điều chỉnh pH 6,5 (bằng NaOH).

Lấy 80 µL dung dịch bacteriocin thô nhỏ vào mỗi giếng của đĩa thạch đã chứa dòng chỉ thị. Ủ ở 4°C trong 15 phút và ủ 35°C trong 48 giờ. Xác định đường kính vòng vô khuẩn quanh giếng thạch.

2.2.6. Khảo sát khả năng lên men axit lactic ở nhiệt độ cao

Bơm 1 mL dịch tăng sinh vi khuẩn lactic vào

99 mL dung dịch sucrose 4% (w/v) và ủ ở 37°C, 38°C, 39°C và 40°C. Xác định hàm lượng axit tổng số mỗi ngày trong 7 ngày bằng phương pháp chuẩn độ.

2.2.7. Phương pháp tính toán và xử lý số liệu

Kết quả nhận được là giá trị trung bình của các lần lặp lại và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Microsoft Excel và xử lý thống kê bằng phần mềm

Minitab 16.2.1.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Phân lập các chủng vi khuẩn lactic thuần từ phụ phẩm nông nghiệp

Tổng cộng có 36 chủng vi khuẩn thuần đã được phân lập các mẫu phụ phẩm nông nghiệp ở An Giang, Bến Tre, Bình Dương, Cần Thơ, Đồng Tháp, Vĩnh Long (Bảng 1).

Bảng 1. Nguồn gốc các chủng vi khuẩn phân lập

Ký hiệu	Số chủng	Mẫu	Nơi thu mẫu	Ký hiệu	Số chủng	Mẫu	Nơi thu mẫu
BA	5	Bắp cải	An Giang	VC	1	Vò bắp	Cần Thơ
CA	3	Cóc	An Giang	XC	3	Xoài	Cần Thơ
CD	4	Chôm chôm	Bình Dương	NT	3	Nhãn	Bến Tre
ND	4	Nhãn	Bình Dương	CT	1	Chôm chôm	Bến Tre
KD	5	Dứa	Đồng Tháp	BV	1	Bòn bon	Vĩnh Long
CC	2	Cùi bắp	Cần Thơ	VV	1	Vải	Vĩnh Long
KC	3	Dứa	Cần Thơ				

3.2. Định danh sơ bộ các chủng vi khuẩn phân lập

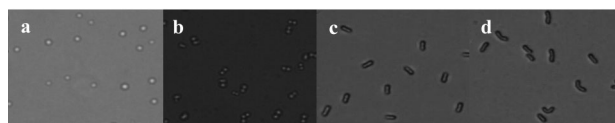
3.2.1. Đặc điểm hình thái các chủng vi khuẩn phân lập

Bảng 2 trình bày đặc điểm hình thái của 36 chủng vi khuẩn phân lập. Tất cả 36 chủng vi khuẩn phân lập đều có khuẩn lạc dạng tròn, bìa nguyên. Đa

số vi khuẩn có kích thước khuẩn lạc trong khoảng 1-3 mm. 30/36 chủng có khuẩn lạc màu trắng đục ngoài khuẩn lạc các chủng BA5, CA1, CC2, KC1, KC3 và NT2 có màu trắng trong. Trong 36 chủng, ngoài 3 chủng KC1, KC2 và KC3 có khuẩn lạc bề mặt phẳng, 33 chủng còn lại có khuẩn lạc bề mặt trơn lồi. Tất cả các chủng vi khuẩn đều không di động.

Bảng 2. Đặc điểm hình thái của các chủng vi khuẩn phân lập

STT	Chủng vi khuẩn	Hình thái tế bào	STT	Chủng vi khuẩn	Hình thái tế bào
1	BA1	Cầu đơn	19	KD3	Cầu, kết đôi
2	BA2	Cầu, kết chuỗi	20	KD4	Que ngắn
3	BA3	Que dài	21	KD5	Que ngắn, kết đôi
4	BA4	Que dài, kết đôi	22	CC1	Cầu, kết đôi
5	BA5	Que ngắn	23	CC2	Cầu, kết đôi
6	CA1	Cầu, kết chuỗi	24	KC1	Cầu, kết đôi
7	CA2	Que dài, kết đôi	25	KC2	Cầu, kết chuỗi
8	CA3	Cầu, kết đôi	26	KC3	Que ngắn
9	CD1	Que ngắn, kết đôi	27	VC1	Cầu, kết chuỗi
10	CD2	Cầu, kết đôi	28	XC1	Que ngắn, kết đôi
11	CD3	Cầu, kết chuỗi	29	XC2	Cầu, kết đôi
12	CD4	Cầu, kết đôi	30	XC3	Cầu, kết đôi
13	ND1	Cầu, kết chuỗi	31	NT1	Cầu, kết chuỗi
14	ND2	Cầu, kết đôi	32	NT2	Cầu, kết đôi
15	ND3	Que ngắn	33	NT3	Que ngắn, kết đôi
16	ND4	Que ngắn, kết đôi	34	CT1	Que ngắn
17	KD1	Cầu, kết đôi	35	BV1	Cầu, kết đôi
18	KD2	Que dài	36	VV1	Que ngắn



Hình 1. Hình thái các chủng vi khuẩn phân lập ở độ phóng đại 1000 lần

(a) Chủng BA1 hình cầu đơn; (b) Chủng KD3 hình cầu, kết đôi; (c) Chủng CD1 hình que ngắn, kết đôi; (d) Chủng CA2 hình que dài kết đôi

Dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 1000 lần các chủng vi khuẩn phân lập có dạng hình que và hình cầu (Hình 1). Trong đó, có 6 chủng có dạng que ngắn; 5 chủng que ngắn, kết đôi; 2 chủng

que dài; 2 chủng que dài, kết đôi, 1 chủng hình cầu đơn, 13 chủng hình cầu, kết đôi và 7 chủng có hình cầu, kết chuỗi.

3.2.2. Đặc điểm sinh hóa của các chủng vi khuẩn phân lập

Đặc tính sinh hoá của các chủng vi khuẩn được ghi nhận trong Bảng 3. Qua các thử nghiệm ở Bảng 2 và 3, có thể kết luận các chủng vi khuẩn phân lập được thuộc nhóm vi khuẩn lactic dựa vào các đặc điểm sau: vi khuẩn Gram dương, không có hoạt tính enzyme catalase và oxydase, có thể phát triển được trên môi trường MRS, có dạng hình que hay hình cầu.

Bảng 3. Đặc điểm sinh hóa của các chủng vi khuẩn phân lập

Chủng	Gram	Catalase	Oxydase	Thử Uferment	Vòng phân giải CaCO ₃ (mm)	
					Ngày 1	Ngày 2
BA1	+ ¹	- ¹	- ¹	++ ²	0,867	0,967
BA2	+	-	-	+	0,800	0,800
BA3	+	-	-	++	1,000	1,133
BA4	+	-	-	+	1,000	1,100
BA5	+	-	-	++	0,733	0,767
CA1	+	-	-	+	1,200	1,367
CA2	+	-	-	++	1,167	1,467
CA3	+	-	-	+	0,967	1,067
CD1	+	-	-	++	0,900	0,967
CD2	+	-	-	++	1,000	1,070
CD3	+	-	-	+	1,133	1,233
CD4	+	-	-	++	0,967	1,167
ND1	+	-	-	++	1,333	1,367
ND2	+	-	-	++	1,100	1,267
ND3	+	-	-	++	1,167	1,433
ND4	+	-	-	++	1,000	1,067
KD1	+	-	-	+	1,000	1,100
KD2	+	-	-	++	1,000	1,133
KD3	+	-	-	++	1,070	1,267
KD4	+	-	-	++	0,867	1,100
KD5	+	-	-	++	1,070	1,100
CC1	+	-	-	++	1,067	1,433
CC2	+	-	-	++	1,130	1,300
KC1	+	-	-	++	1,000	1,100
KC2	+	-	-	+	0,633	0,633
KC3	+	-	-	++	1,067	1,167
VC1	+	-	-	++	0,900	1,000
XC1	+	-	-	++	0,667	0,700

XC2	+	-	-	++	0,733	0,767
XC3	+	-	-	+	0,667	0,733
NT1	+	-	-	+	1,000	1,133
NT2	+	-	-	+	0,967	1,067
NT3	+	-	-	++	1,033	1,100
CT1	+	-	-	+	1,167	1,367
BV1	+	-	-	+	0,967	1,000
VV1	+	-	-	+	1,033	1,100

Ghi chú: ¹(+): dương tính và (-): âm tính; ² Thể hiện mức độ chuyển màu thuốc thử uferment.

3.3. Khả năng chịu nhiệt của các chủng vi khuẩn lactic

Bảng 4. Kết quả khả năng chịu nhiệt của các chủng vi khuẩn lactic

Chủng	Nhiệt độ						Chủng	Nhiệt độ					
	37	39	41	43	45	47		37	39	41	43	45	47
BA1	+	+	+	+	+	-	KD3	+	+	+	+	+	+
BA2	+	+	+	+	+	-	KD4	+	+	+	+	+	-
BA3	+	+	+	+	+	-	KD5	+	+	+	+	+	+
BA4	+	+	+	+	-	-	CC1	+	+	+	+	-	-
BA5	+	+	+	+	+	-	CC2	+	+	+	+	+	-
CA1	+	+	+	+	+	-	KC1	+	+	+	+	+	-
CA2	+	+	+	+	+	-	KC2	+	+	+	+	+	+
CA3	+	+	+	+	+	-	KC3	+	-	-	-	-	-
CD1	+	+	+	+	+	-	VC1	+	+	+	+	+	-
CD2	+	+	+	+	+	+	XC1	+	+	+	+	-	-
CD3	+	+	+	+	+	-	XC2	+	+	+	+	+	-
CD4	+	+	+	+	+	+	XC3	+	+	+	+	-	-
ND1	+	+	+	+	+	+	NT1	+	-	-	-	-	-
ND2	+	+	+	+	+	+	NT2	+	+	+	+	-	-
ND3	+	+	+	+	+	-	NT3	+	+	+	+	-	-
ND4	+	+	+	-	-	-	CT1	+	+	+	+	-	-
KD1	+	+	+	+	-	-	BV1	+	+	+	+	+	+
KD2	+	+	+	+	+	+	VV1	+	+	+	+	-	-

Ghi chú: (+) phát triển khuẩn lạc, (-) không phát triển khuẩn lạc.

Bảng 4 cho thấy tất cả các chủng vi khuẩn đều phát triển được ở 37°C. Có 34/36 chủng phát triển được ở 39°C và 41°C. Ở 43°C có 33/36 chủng phát triển. 12/36 chủng không phát triển ở 45°C. Ở 47°C chỉ có 9 chủng có thể phát triển. Theo Jenkins (2005), vi khuẩn chịu nhiệt (*Thermophilic*) có khả năng sống trên 45°C nên các chủng vi khuẩn phân lập là vi khuẩn lactic ưa nhiệt trung bình (*Mesophilic*) có thể sống ở dãy nhiệt độ từ 20-45°C [5]. Trong đó các chủng CD2, CD4, ND1, ND2, KD2, KD3, KD5, KC2, BV1 là những chủng vi khuẩn chịu nhiệt có thể sống và phát triển ở nhiệt độ đến 47°C, cao hơn so với các chủng còn lại.



Hình 2. Vi khuẩn lactic phát triển ở 47°C

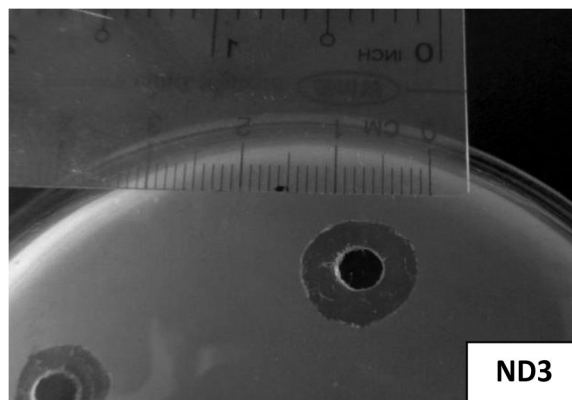
3.4. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn và sinh bacteriocin

Bảng 5. Khả năng ức chế *B. subtilis* bằng phương pháp “khuếch tán trên giếng thạch”

STT	Chủng	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)	STT	Chủng	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)
1	BA1	8,67 ^{ede}	19	KD3	7,33 ^{fghi}
2	BA2	7,67 ^{efgh}	20	KD4	6,67 ^{hi}
3	BA3	8,33 ^{cdef}	21	KD5	7,00 ^{ghi}
4	BA4	10,33 ^{ab}	22	CC1	9,00 ^{cd}
5	BA5	7,67 ^{efgh}	23	CC2	8,67 ^{ede}
6	CA1	8,67 ^{ede}	24	KC1	8,00 ^{defg}
7	CA2	8,67 ^{ede}	25	KC2	8,33 ^{cdef}
8	CA3	0 ^k	26	KC3	8,33 ^{cdef}
9	CD1	7,00 ^{ghi}	27	VC1	6,67 ^{hi}
10	CD2	7,00 ^{ghi}	28	XC1	0 ^k
11	CD3	6,67 ^{hi}	29	XC2	0 ^k
12	CD4	6,33 ⁱ	30	XC3	0 ^k
13	ND1	10,33 ^{ab}	31	NT1	9 ^{cd}
14	ND2	9,33 ^{bc}	32	NT2	0 ^k
15	ND3	11,00 ^a	33	NT3	8,00 ^{defg}
16	ND4	10,33 ^{ab}	34	CT1	10,33 ^{ab}
17	KD1	8,67 ^{ede}	35	BV1	0 ^k
18	KD2	7,00 ^{ghi}	36	VV1	0 ^k

Ghi chú: Giá trị trung bình của 3 lần lặp lại có ký tự giống nhau khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%.

Bảng 5 cho thấy có 7/36 chủng vi khuẩn (CA3, XC1, XC2, XC3, NT2, VV1, BV1) không sinh bacteriocin ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn chỉ thị, các chủng còn lại đều có khả năng kháng vi khuẩn chỉ thị và sinh vòng kháng khuẩn từ 7,33-11 mm. Bảng 5 và Hình 3 cho thấy 5 chủng ND3, ND1, ND4, CT1 và BA4 tạo vòng vô khuẩn lớn hơn 10 mm nên thể hiện tính kháng mạnh. Trong đó, chủng ND3 có đường kính vòng sáng rộng nhất là 11 mm và thể hiện tính kháng mạnh nhất. Đường kính vòng kháng khuẩn 11 mm là tốt hơn so với nghiên cứu của Huỳnh Nguyễn Như Thu (2015) với đường kính vòng kháng đạt 10,33 mm [9]. Kết hợp với thử nghiệm chịu nhiệt, Chủng ND1 có thể sinh trưởng ở 47°C và có khả năng sinh bacteriocin ức chế mạnh được chủng *B. subtilis*. Kết quả cho thấy chủng ND1 có tiềm năng được sử dụng để sản xuất bacteriocin dùng trong bảo quản thực phẩm và sản xuất các chế phẩm sinh học.



Hình 3. Chủng ND3 có tính kháng khuẩn mạnh

3.5. Khảo sát khả năng lên men đường saccharose của các chủng vi khuẩn ở nhiệt độ cao

Bảng 6. Hàm lượng axit (g/L) sinh ra theo thời gian của 10 chủng vi khuẩn

Chủng	Nhiệt độ	Hàm lượng axit ngày 5	Chủng	Nhiệt độ	Hàm lượng axit ngày 5
BA1	37	0,675 ^{fghijk}	KD3	37	0,525 ^{ghijk}
	38	0,825 ^{defghij}		38	1,425 ^{abc}
	39	0,9 ^{cdefghi}		39	0,675 ^{fghijk}
	40	0,675 ^{fghijk}		40	0,45 ^{hijk}
CA2	37	0,525 ^{ghijk}	KD5	37	0,525 ^{ghijk}
	38	0,75 ^{efghijk}		38	0,675 ^{fghijk}
	39	0,75 ^{efghijk}		39	0,675 ^{fghijk}
	40	0,675 ^{fghijk}		40	0,525 ^{ghijk}
CC2	37	0,525 ^{ghijk}	ND2	37	0,45 ^{hijk}
	38	1,425 ^{abc}		38	1,125 ^{bcdef}
	39	1,125 ^{bcdef}		39	0,825 ^{defghij}
	40	0,6 ^{fghijk}		40	0,45 ^{hijk}
CD2	37	0,9 ^{cdefghi}	ND3	37	0,675 ^{fghijk}
	38	0,75 ^{efghijk}		38	1,05 ^{bcdefg}
	39	0,6 ^{fghijk}		39	0,75 ^{efghijk}
	40	0,45 ^{hijk}		40	0,525 ^{ghijk}
CD4	37	0,525 ^{ghijk}	NT4	37	0,375 ^{ijk}
	38	0,675 ^{fghijk}		38	1,125 ^{bcdef}
	39	0,675 ^{fghijk}		39	0,675 ^{fghijk}
	40	0,45 ^{hijk}		40	0,6 ^{fghijk}

Bảng 6 cho thấy chủng lên men mạnh nhất là CC2 và KD3, nhiệt độ tối ưu nhất cho quá trình lên men là 38°C, và hàm lượng axit tổng đạt được cao nhất vào ngày thứ 5 đạt 1,425. Tuy nhiên khả năng sinh axit ở 39°C của chủng CC2 (1,125 g/L) là tốt hơn chủng KD3 (0,675 g/L). Lượng axit tổng số sinh

ra thấp hơn so với kết quả của Nguyễn Văn Chương (2008) khi lên men đường sucrose từ các chủng vi khuẩn lactic được phân lập từ tự nhiên để sản xuất mĂNG chua (chủng có lượng axit tổng số cao nhất là 3,06783% (w/v) [2]. Kết quả thấp hơn các chủng từ mĂNG chua là do vi khuẩn lactic trong đề tài này là các chủng chịu nhiệt được lên men ở nhiệt độ cao hơn.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập được 36 chủng vi

khuẩn lactic, trong đó 9 chủng (CD2, CD4, ND1, ND2, KD2, KD3, KD5, KC2, BV1) có khả năng chịu nhiệt đến 47°C; hai mươi chín chủng có khả năng kháng chủng vi khuẩn chỉ thị, trong đó chủng ND3 tạo đường kính vòng kháng khuẩn cao nhất, đạt đến 11 mm. Chủng CC2 có khả năng lên men dịch đường sucrose 4% (w/v) tạo ra axit tổng đạt cao nhất (1,425 g/L) sau 5 ngày lên men ở 38°C/.

Tài liệu tham khảo

[1]. S. P. Chahal (2000), *Lactic acid*, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Widnes: Croda Colloids Ltd, United Kingdom.

[2]. Nguyễn Văn Chương (2008), *Phân lập vi khuẩn Lactobacillus thuần từ tự nhiên để sản xuất mĂNG tre lên men chua*, Đề tài nghiên cứu khoa học cấp trường, Khoa Nông nghiệp và Tài nguyên Thiên nhiên, Trường Đại học An Giang, An Giang.

[3]. J. D. De Man, M. Rogosa and M. E. Sharpe (1960), "A Medium for the Cultivation of Lactobacilli", *The Journal of Applied Bacteriology*, (23), p. 130-135.

[4]. D. Hernández, E. Cardell and V. Zárate (2004), "Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711", *Journal of Applied Microbiology*, (99), p. 77-84.

[5]. J. C. Jenkins (2005), *The Humanure Handbook: A Guide to Composting Human Manure*, 3rd edition. Joseph Jenkins, Inc. PA, USA.

[6]. C. Kotzamanidis, T. Roukas and G. Skaracis (2002), "Optimization of lactic acid production from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130", *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, (18), p. 441-448.

[7]. Fabio Andres Castillo Martineza, Eduardo Marcos Balciunasa, Jose Manuel Salgadob, Jose Manuel Dominguez Gonzalezb, Attilio Convertic and Ricardo Pinheiro de Souza Oliveiraa. (2013), "Lactic acid properties, applications and production: A review", *Trends in Food Science & Technology*, (30), p. 70-83.

[8]. M. San-Martin, C. Pazos and J. Coca (1992), "Reactive extraction of lactic acid with alamine 336 in the presence of salts and lactose", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, (54), p. 1-6.

[9]. Huỳnh Nguyễn Như Thu (2015), *Tuyển chọn, khảo sát mối quan hệ di truyền của một số chủng vi khuẩn lactic chịu nhiệt và thử nghiệm sản xuất sinh khối*, Luận văn tốt nghiệp đại học ngành Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ, Cần Thơ.

[10]. H. Tsuji, T. Saeki, T. Tsukegi, H. Daimon and K. Fujie (2008), "Comparative study on hydrolytic degradation and monomer recovery of poly(L-lactic acid) in the solid and in the melt", *Polymer Degradation and Stability*, 93 (10), p. 1956-1963.

[11]. Viện Khoa học và Công nghệ môi trường (2011), *Báo cáo môi trường quốc gia 2011*, Đại học Bách khoa Hà Nội, Hà Nội.

ISOLATING AND SELECTING THERMOTOLERANT LACTIC ACID BACTERIA FROM AGRICULTURAL WASTES

Summary

This study investigates strains of lactic acid bacteria with good thermotolerant anti-bacterial and fermentation abilities from agricultural wastes collected from Mekong Delta areas and Binh Duong province. The results are 36 lactic acid bacteria strains were isolated with corresponding biochemical properties. Among them, 8 strains could grow at high temperature up to 47°C. And 29 strains could inhibit the indicated strain of *Bacillus subtilis*. Especially, 5 strains (ND3, ND1, ND4, CT1, BA4) could produce inhibition zones larger than 10 mm. Among 10 strains analyzed for acid fermentation, strain CC2 could ferment sucrose 4% (w/v) medium and produce highest total acid concentration at 38°C of 1.425 g/L after 5 days.

Keywords: Thermotolerant, anti-bacteria, lactic acid fermentation, agricultural wastes, lactic acid bacteria.
Ngày nhận bài: 12/12/2017; Ngày nhận lại: 31/01/2018; Ngày duyệt đăng: 10/4/2018.