

PHÂN LẬP MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN LACTIC ỨNG DỤNG TRONG CHẾ BIẾN DƯA MUỐI CHUA

● KHUÛU PHƯƠNG YẾN ANH

TÓM TẮT:

Tiến hành phân lập được 12 chủng vi khuẩn lactic từ 30 mẫu dưa muối, bằng phương pháp định lượng acid lactic có trong dịch lên men, tuyển chọn và định danh được 2 chủng có khả năng sinh acid lactic cao: chủng L1 (0,0045 g) thuộc chi *Leuconostoc*, chủng L2 (0,0063 g) thuộc chi *Pediococcus*. Kết quả khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh acid lactic của 2 chủng vi khuẩn lactic L1 và L2 nhận thấy độ mặn thích hợp để 2 chủng phát triển là 4% - 6% với điều kiện nhiệt độ trong khoảng 25-30°C, trong môi trường có pH 6, lên men khoảng 3-4 ngày, dịch lên men có hàm lượng acid lactic từ 0,06-0,2 g là nồng độ thích hợp để có hương dưa muối chua ngon.

Từ khóa: vi khuẩn lactic, dưa muối chua, acid lactic, *Leuconostoc*, *Pediococcus*.

1. Đặt vấn đề

Ngộ độc thực phẩm do nhiễm vi sinh vật gây bệnh, độc tố... là vấn đề quan tâm của toàn xã hội. Việc sử dụng những chất bảo quản nhân tạo gây ảnh hưởng xấu đến sức khỏe người tiêu dùng. Dưa muối là sản phẩm lên men lactic truyền thống Việt Nam, có giá trị dinh dưỡng cao, có lợi cho đường tiêu hóa với hệ lợi khuẩn phát triển. Muối dưa là quá trình lên men lactic do vi khuẩn lactic có sẵn trong rau dưa. Tuy nhiên, những tạp khuẩn gây hỏng quá trình muối chua (vi khuẩn acetic, butyric, vi khuẩn hoại sinh và nấm mốc). Vì vậy, cần tạo điều kiện thuận lợi cho vi khuẩn lactic phát triển và đến khi đã tích tụ được acid lactic trong nước dưa sẽ ức chế các vi khuẩn khác [2-3]. Sử dụng các vi khuẩn lactic làm chất bảo quản thức ăn tự nhiên với mục đích làm tăng độ an toàn, chống lại sự hoạt động của các vi sinh vật gây hư

hỏng và bảo đảm được chất lượng thực phẩm là hướng nghiên cứu cần đẩy mạnh. Từ đó, nghiên cứu “Phân lập một số chủng vi khuẩn lactic ứng dụng trong chế biến dưa muối chua” được thực hiện, nhằm tìm ra chủng vi khuẩn lactic thuần, nghiên cứu môi trường thích hợp để vi khuẩn lactic sinh trưởng tối ưu và sinh acid lactic cao, là cơ sở để chế biến dưa muối, rút ngắn được thời gian chế biến, đảm bảo dinh dưỡng và vệ sinh an toàn thực phẩm, bảo vệ sức khỏe của người sử dụng thực phẩm.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Thí nghiệm 1: Phân lập chủng vi khuẩn lactic

- Lấy 10 mL mẫu nước dưa muối cho vào ống nghiệm, thêm 90 mL nước cất vô trùng, lắc đều được dung dịch 10-1. Hút 1 mL dung dịch 10-1 cho vào ống nghiệm chứa 9 mL nước cất vô trùng,

được dung dịch pha loãng nồng độ 10-2. Tiếp tục pha loãng đến dung dịch nồng độ 10-3, 10-4, 10-5.

- Nhỏ 2 giọt dung dịch ở mỗi nồng độ lên đĩa petri chứa môi trường VL. Dùng que trang trải đều khắp mặt thạch. Lật ngược đĩa petri, gói, ủ ở nhiệt độ phòng từ 3 - 7 ngày. Chọn khuẩn lạc riêng rẽ cấy truyền sang ống nghiệm thạch nghiêng. Quan sát hình thái đại thể và vi thể [9].

2.2. Thí nghiệm 2: Xác định hoạt tính acid lactic bằng phương pháp định tính, định lượng acid lactic

Phương pháp định tính acid lactic: nhằm xác định sự có mặt của acid lactic trong dịch lên men, dựa trên các phản ứng màu đặc trưng của acid lactic với một số hợp chất khác nhau để xác định sự có mặt của chúng trong quá trình lên men lactic.

- Nuôi vi khuẩn trong môi trường VL lỏng (không agar). Sau 3 ngày, hút 3 mL dịch lên men cho vào ống nghiệm. Nhỏ 3 giọt thuốc thử ufenmen vào ống nghiệm.

- Kết quả: nếu dung dịch có acid lactic thì thuốc thử từ màu xanh tím chuyển sang màu vàng [9].

Phương pháp định lượng acid lactic: nhằm xác định hàm lượng của acid lactic trong quá trình lên men lactic.

- Nuôi vi khuẩn trong 3 ngày, thu dịch lên men. Cho vào ống nghiệm 10 mL dịch lên men. Thêm 20 mL nước cất. Nhỏ 1-2 giọt phenoltaphlein. Lắc thật kỹ để trộn đều các chất. Chuẩn độ dung dịch bằng NaOH 0,1N (cho đến khi dung dịch xuất hiện màu hồng).

- Cách tính:

Khối lượng acid lactic = Số mL dung dịch NaOH 0,1 N * 0,009g acid lactic [9].

2.3. Thí nghiệm 3: Phương pháp định danh vi khuẩn lactic

Nhuộm Gram: Dựa trên khả năng bắt màu của tế bào chất và màng tế bào với thuốc nhuộm tím kết tinh và iod.

Trên lame kính nhỏ một giọt nước cất, dùng que cấy lấy một ít khuẩn lạc (vi khuẩn). Làm vết bôi, đợi đến khi nước cất trên lame khô, nhỏ thêm một giọt cồn để khô tự nhiên hay trên ngọn lửa đèn cồn. Đặt một miếng giấy lọc lên vết bôi. Nhuộm tiêu bản bằng thuốc nhuộm tím kết tinh qua giấy lọc trong 1 phút. Nhuộm Lugol trong 1

phút. Rửa lại bằng nước cất. Tẩy bằng cồn trong 30 giây. Rửa lại bằng nước. Nhuộm bổ sung bằng Fuchsin từ 30 giây - 1 phút. Rửa lại bằng nước. Làm khô và quan sát hình thái tế bào dưới kính hiển vi [9].

Thử hoạt tính catalase: Catalase thủy phân H_2O_2 thành H_2O và O_2 , ngăn cản sự tích tụ phân tử có độc tính cao này trong tế bào. Sự thủy phân H_2O_2 sẽ giải phóng O_2 được ghi nhận qua hiện tượng sủi bọt khí.

- Dùng que cấy lấy một ít sinh khối từ khuẩn lạc thuần đặt trên một lame sạch. Nhỏ một giọt H_2O_2 30% lên sinh khối vi sinh vật trên lame. Ghi nhận sự sủi bọt nếu có. Hoặc có thể bằng cách chuyển một ít sinh khối của khuẩn lạc lên lame, nhỏ một giọt H_2O_2 0,5% rồi đập lại bằng lamel. Ghi nhận nếu có sự xuất hiện của bọt khí bị giữ lại giữa lame và lamel.

- Đọc kết quả

+ Dương tính (+): khi có hiện tượng sủi bọt khí do khí O_2 được tạo ra.

+ Âm tính (-): khi không có hiện tượng sủi bọt khí [8].

Khảo sát nguồn cacbohydrate lên men:

- Môi trường nuôi cấy VL với thành phần và tỷ lệ không thay đổi. Thay thế glucose bằng saccarose, fructose, lactose, maltose với tỷ lệ 20 g trong 1 lít môi trường, lên men 3 ngày.

- Định lượng lượng acid lactic sau khi lên men bằng phương pháp chuẩn độ NaOH.

Khảo sát lên men ở nhiệt độ 4°C và 45°C: Lấy khuẩn lạc có đường kính 2 ım từ chủng vi khuẩn đã phân lập, cấy vào 2 ống nghiệm có sẵn môi trường nuôi. Ủ ở 2 nhiệt độ khác nhau 4°C và 45°C. Sau khi nuôi cấy được khoảng 3 ngày, tiến hành định lượng acid lactic bằng phương pháp chuẩn độ [5].

2.4. Thí nghiệm 4: Xác định các yếu tố môi trường ảnh hưởng khả năng sinh acid lactic của chủng vi khuẩn

Ảnh hưởng của thời gian: Lấy khuẩn lạc có đường kính 2 ım từ chủng đã phân lập, cấy vào hai ống nghiệm có sẵn môi trường VL lỏng. Nuôi trong môi trường ở các thời gian khác nhau: 3 ngày, 4 ngày, 5 ngày, 6 ngày, 7 ngày. Sau đó tiến hành định lượng acid lactic bằng phương pháp chuẩn độ.

Ảnh hưởng của pH: Tiến hành nuôi vi khuẩn lactic trên môi trường sinh acid lactic cao nhất được chọn ở thí nghiệm trên, dùng HCl 5%, NaOH 5% điều chỉnh pH về các độ pH 4, 5, 6, 7, 8.

Ảnh hưởng của độ mặn: Tiến hành nuôi vi khuẩn lactic trên môi trường sinh acid lactic cao nhất với thời gian và pH tốt nhất ở 2 thí nghiệm trên, điều chỉnh độ mặn bằng muối vô trùng về các nồng độ khác nhau: 2%, 3%, 4%, 5%, 6%.

Ảnh hưởng nhiệt độ: Nuôi vi khuẩn lactic trên môi trường sinh acid lactic cao nhất với thời gian có pH, độ mặn tốt nhất ở 3 thí nghiệm trên và ủ ở các nhiệt độ khác nhau 25°C, 30°C, 35°C, 40°C.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả tuyển chọn vi khuẩn lactic

Từ 30 mẫu dưa muối thu được tại chợ Mỹ Xuyên, thành phố Long Xuyên, An Giang, tiến hành phân lập, quan sát hình thái khuẩn lạc và hình dạng tế bào xác định được 12 chủng vi khuẩn lactic khác nhau. Tiến hành định tính, định lượng acid lactic có trong dịch lên men, kết quả cho thấy 12 chủng đều có khả năng sinh acid lactic. Chọn

Bảng 1. Kết quả định lượng acid lactic của 12 chủng vi khuẩn lactic phân lập

Chủng	Hàm lượng acid lactic (g)	Chủng	Hàm lượng acid lactic (g)
L1	0,0045	L12	0,0027
L2	0,0063	L13	0,0018
L5	0,0036	L14	0,0009
L9	0,0018	L15	0,0009
L10	0,0009	L17	0,0009
L11	0,0018	L19	0,0009

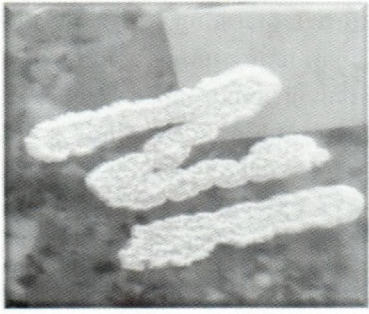
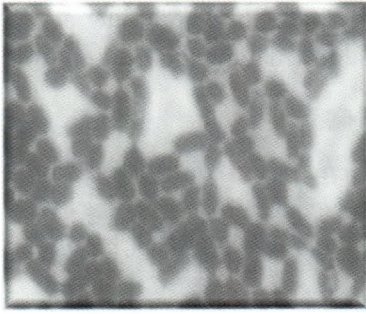
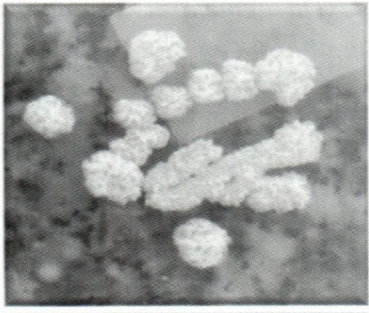
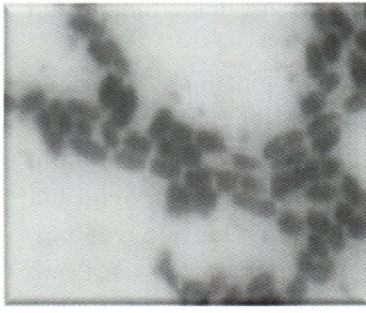
được 2 chủng vi khuẩn L1 (0,0045 g), L2 (0,0063 g) sinh acid lactic với hàm lượng cao. (Bảng 1).

3.2. Đặc điểm sinh học của hai chủng lactic

3.2.1. Đặc điểm hình thái

Tiến hành nhuộm Gram, quan sát hình thái khuẩn lạc và hình dạng tế bào chủng L1, L2 dưới kính hiển vi. Kết quả quan sát được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Đặc điểm hình thái chủng L1 và L2

Chủng	Khuẩn lạc	Hình dạng tế bào	Đặc điểm
L1			Khuẩn lạc màu trắng đục, nổi. Tế bào hình oval, kết thành đám.
L2			Khuẩn lạc màu trắng đục, nổi. Tế bào hình oval, kết thành đám.

3.2.2. Đặc điểm sinh lý - sinh hóa

Tiến hành các thí nghiệm quan sát các đặc điểm sinh lý - sinh hóa của 2 chủng vi khuẩn lactic L1 và L2 như thử catalase, khảo sát lên men đường, khảo sát lên men ở nhiệt độ 4°C và 45°C và dựa trên các yếu tố khảo sát nhằm định danh 2 chủng vi khuẩn lactic tuyển chọn. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Một số đặc tính sinh lý - sinh hóa của 2 chủng L1, L2

Đặc điểm		Chủng L1	Chủng L2
Sinh trưởng	ở 4°C	-	-
	ở 30°C	+	+
	ở 45°C	-	-
Hoạt tính catalase		-	-
Quan hệ với O ₂		Kị khí bắt buộc	Kị khí không bắt buộc
Lên men đường	Glucose	++	++
	Saccarose	++	++
	Lactose	++	+
	Mantose	+	++
	Fructose		++
Nồng độ NaCl	ở 2%	++	+
	ở 4%	++	+
	ở 6%	++	+
Sinh khí từ Glucose		+	-

Ghi chú:
(++) phản ứng dương tính, phát triển tốt hoặc có lên men đường.
(+) phản ứng dương tính, phát triển bình thường hoặc có lên men đường.
(-) phản ứng âm tính, không phát triển hoặc không lên men đường.

Từ kết quả quan sát hình thái khuẩn lạc, hình dạng tế bào và kết quả thí nghiệm các đặc điểm sinh lý - sinh hóa, so sánh với bảng phân loại vi khuẩn lactic của Bergey (2012) và Nguyễn Lâm Dũng (2010) [4-5], định danh sơ bộ 2 chủng L1 và L2 đến chi. Kết quả được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả định danh sơ bộ 2 chủng L1, L2

Chủng	Đặc điểm	Tên vi khuẩn (chi)
L1	Tế bào hình oval xếp thành 2, 4 hoặc đám từ glucose sinh acid, sinh khí, không sinh trưởng ở 4°C và 45°C, kị khí bắt buộc.	<i>Leuconostoc</i> sp.
L2	Tế bào hình oval xếp thành chuỗi hoặc đám từ glucose sinh acid, không sinh khí, không sinh trưởng ở 4°C và 45°C, kị khí không bắt buộc.	<i>Pediococcus</i> sp.

3.3. Kết quả khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh acid lactic của 2 chủng vi khuẩn L1 và L2

3.3.1. Ảnh hưởng của thời gian đến khả năng sinh acid lactic

Tốc độ sinh trưởng của vi khuẩn nhanh hay chậm không chỉ phụ thuộc nguồn dinh dưỡng môi trường, mà còn phụ thuộc quan trọng vào thời gian phát triển của vi khuẩn. Mật độ vi khuẩn nhiều hay ít đều dẫn đến hàm lượng acid lactic trong môi trường nuôi cao hay thấp, do đó tiến hành khảo sát ảnh hưởng của thời gian đến hàm lượng acid lactic của 2 chủng ở các thời gian 3 ngày, 4 ngày, 5 ngày, 6 ngày, 7 ngày. Sau đó tiến hành định lượng acid lactic. Kết quả được trình bày ở Bảng 5.

Kết quả ở Bảng 5 cho thấy sau 4 ngày nuôi hàm lượng acid lactic sinh ra cao nhất ở cả 2 chủng L1 (0,21195 g), L2 (0,24510 g), sau đó giảm dần qua các ngày, hàm lượng acid lactic giảm nhanh ở chủng L2. Trong quá trình lên men, lúc đầu hàm lượng acid lactic thấp không ảnh hưởng đến vi khuẩn lactic nhưng khi nồng độ tăng cao có thể sẽ gây ức chế chính vi khuẩn lactic, do đó thời gian lên men càng lâu thì mật độ vi khuẩn sẽ giảm, hàm lượng acid lactic cũng giảm [1], lên men khoảng 4 ngày là thời gian tốt nhất. Ngoài ra, lên men càng lâu, chất lượng cũng như hương vị dưa muối cũng giảm, theo bí quyết muối dưa truyền thống thì dưa

3.2.2. Đặc điểm sinh lý - sinh hóa

Tiến hành các thí nghiệm quan sát các đặc điểm sinh lý - sinh hóa của 2 chủng vi khuẩn lactic L1 và L2 như thử catalase, khảo sát lên men đường, khảo sát lên men ở nhiệt độ 4°C và 45°C và dựa trên các yếu tố khảo sát nhằm định danh 2 chủng vi khuẩn lactic tuyển chọn. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Một số đặc tính sinh lý - sinh hóa của 2 chủng L1, L2

Đặc điểm		Chủng L1	Chủng L2
Sinh trưởng	ở 4°C	-	-
	ở 30°C	+	+
	ở 45°C	-	-
Hoạt tính catalase		-	-
Quan hệ với O ₂		Kị khí bắt buộc	Kị khí không bắt buộc
Lên men đường	Glucose	++	++
	Saccharose	++	++
	Lactose	++	+
	Mantose	+	++
	Fructose		++
Nồng độ NaCl	ở 2%	++	+
	ở 4%	++	+
	ở 6%	++	+
Sinh khí từ Glucose		+	-

Ghi chú:

(++) phản ứng dương tính, phát triển tốt hoặc có lên men đường.

(+) phản ứng dương tính, phát triển bình thường hoặc có lên men đường.

(-) phản ứng âm tính, không phát triển hoặc không lên men đường.

Từ kết quả quan sát hình thái khuẩn lạc, hình dạng tế bào và kết quả thí nghiệm các đặc điểm sinh lý - sinh hóa, so sánh với bảng phân loại vi khuẩn lactic của Bergey (2012) và Nguyễn Lâm Dũng (2010) [4-5], định danh sơ bộ 2 chủng L1 và L2 đến chi. Kết quả được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả định danh sơ bộ 2 chủng L1, L2

Chủng	Đặc điểm	Tên vi khuẩn (chi)
L1	Tế bào hình oval xếp thành 2, 4 hoặc đám từ glucose sinh acid, sinh khí, không sinh trưởng ở 4°C và 45°C, kị khí bắt buộc.	<i>Leuconostoc</i> sp.
L2	Tế bào hình oval xếp thành chuỗi hoặc đám từ glucose sinh acid, không sinh khí, không sinh trưởng ở 4°C và 45°C, kị khí không bắt buộc.	<i>Pediococcus</i> sp.

3.3. Kết quả khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh acid lactic của 2 chủng vi khuẩn L1 và L2

3.3.1. Ảnh hưởng của thời gian đến khả năng sinh acid lactic

Tốc độ sinh trưởng của vi khuẩn nhanh hay chậm không chỉ phụ thuộc nguồn dinh dưỡng môi trường, mà còn phụ thuộc quan trọng vào thời gian phát triển của vi khuẩn. Mật độ vi khuẩn nhiều hay ít đều dẫn đến hàm lượng acid lactic trong môi trường nuôi cao hay thấp, do đó tiến hành khảo sát ảnh hưởng của thời gian đến hàm lượng acid lactic của 2 chủng ở các thời gian 3 ngày, 4 ngày, 5 ngày, 6 ngày, 7 ngày. Sau đó tiến hành định lượng acid lactic. Kết quả được trình bày ở Bảng 5.

Kết quả ở Bảng 5 cho thấy sau 4 ngày nuôi hàm lượng acid lactic sinh ra cao nhất ở cả 2 chủng L1 (0,21195 g), L2 (0,24510 g), sau đó giảm dần qua các ngày, hàm lượng acid lactic giảm nhanh ở chủng L2. Trong quá trình lên men, lúc đầu hàm lượng acid lactic thấp không ảnh hưởng đến vi khuẩn lactic nhưng khi nồng độ tăng cao có thể sẽ gây ức chế chính vi khuẩn lactic, do đó thời gian lên men càng lâu thì mật độ vi khuẩn sẽ giảm, hàm lượng acid lactic cũng giảm [1], lên men khoảng 4 ngày là thời gian tốt nhất. Ngoài ra, lên men càng lâu, chất lượng cũng như hương vị dưa muối cũng giảm, theo bí quyết muối dưa truyền thống thì dưa

ăn ngon nhất trong mỗi mL nước dưa có chứa khoảng 0,05 - 0,1 g acid lactic [4]. Dựa theo kết quả khảo sát thì khoảng 3 - 4 ngày trong dịch lên men hàm lượng acid lactic đã đạt 0,06 - 0,2 g, do đó muối dưa trong khoảng 3 - 4 ngày là thích hợp nhất.

3.3.2. Ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh acid lactic

pH môi trường cũng là nhân tố quyết định đến khả năng sinh trưởng của vi khuẩn lactic, với 2 chủng L1 và L2 tiến hành nuôi ở các giá trị pH của môi trường lần lượt 4, 5, 6, 7, 8. Sau 4 ngày nuôi, tiến hành định lượng acid lactic. Kết quả 3 lần lặp lại được trình bày ở Bảng 6.

Dựa trên kết quả trình bày ở Bảng 6 có thể nhận thấy môi trường pH 6 có giá trị hàm lượng acid lactic cao nhất trong 4 giá trị pH khảo sát. Chủng L1, hàm lượng acid lactic thấp nhất ở pH 5 và ở pH 4-7 hàm lượng acid lactic lại không có sai khác. Đối với chủng L2, hàm lượng acid lactic thấp nhất ở pH 4 và không có chênh lệch ở pH 5-7, do các vi khuẩn lactic sinh trưởng tối thích với môi trường có giá trị pH 5,8-6. Giá trị pH càng cao càng bất lợi đối với chính vi khuẩn lactic sinh acid lactic, vì pH cao thích hợp cho các vi khuẩn gây thối phát triển ức chế các vi khuẩn lactic, gây hư hỏng sản phẩm lên men. Hơn thế, giá trị pH dễ dàng bị thay đổi do điều kiện tác động từ môi trường bên ngoài, hơn thế do hàm lượng acid lactic trong dịch lên men cũng gây ra sự thay đổi giá trị pH [6].

3.3.3. Ảnh hưởng của độ mặn đến khả năng sinh acid lactic

Độ mặn (nồng độ NaCl) có vai trò quan trọng trong bảo quản thực phẩm và có thể làm chết vi khuẩn nếu nồng độ NaCl trong môi trường quá cao, do đó tiến hành khảo sát nồng độ NaCl ảnh hưởng đến sinh hàm lượng acid lactic của 2 chủng L1 và L2 ở các nồng độ 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, nuôi trong môi trường VL lỏng sau 4 ngày tiến hành định

Bảng 5. Kết quả khảo sát thời gian (1)

Chủng	3 ngày	4 ngày	5 ngày	6 ngày	7 ngày
L1	0,0615	0,21195	0,14385	0,1509	0,15465
L2	0,0565	0,24510	0,21171	0,16101	0,054923

[1] Kết quả là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại.

Ghi chú: Hàm lượng acid lactic khảo sát với 3 lần lặp lại được kiểm tra ANOVA trong SPSS 16.0 có mức ý nghĩa 95%.

Bảng 6. Kết quả khảo sát pH (2)

Chủng	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
L1	0,0624	0,042533	0,075167	0,061017	0,0487
L2	0,054	0,05685	0,064633	0,0564	0,0594

[2] Kết quả là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại.

Ghi chú: Hàm lượng acid lactic khảo sát với 3 lần lặp lại được kiểm tra ANOVA trong SPSS 16.0 có mức ý nghĩa 95%.

Bảng 7. Kết quả khảo sát nồng độ NaCl(3)

Chủng	2%	3%	4%	5%	6%
L1	0,23853	0,17375	0,2235	0,3462	0,36345
L2	0,12195	0,1365	0,12851	0,13473	0,16215

[3] Kết quả là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại.

Ghi chú: Hàm lượng acid lactic khảo sát với 3 lần lặp lại được kiểm tra ANOVA trong SPSS 16.0 có mức ý nghĩa 95%.

lượng hàm lượng acid lactic. Kết quả được trình bày ở Bảng 7.

Vi khuẩn lactic là vi khuẩn ưa muối cao, trong đó một số chi có thể chịu được nồng độ NaCl 18% [5]. Dựa trên kết quả số liệu Bảng 7, nhận thấy hàm lượng acid tăng dần khi đồng thời tăng nồng độ NaCl. Đối với chủng L1, giá trị tăng rõ qua các nồng độ khảo sát, giá trị đạt cao nhất ở 6% NaCl trong khi đó, chủng L2 các giá trị gần nhau không có sự chênh lệch rõ ràng giữa các giá trị khảo sát điều đó cho thấy chủng L1 chịu được nồng độ NaCl cao hơn chủng L2, tuy trong cùng điều kiện nuôi cấy như nhau. Hơn thế, dựa trên bảng phân loại vi sinh vật theo khả năng chịu mặn thì chủng L1 thuộc loại chịu muối cao 5-20% [4] và chủng L2 thuộc loại chịu muối nhẹ 2-5%. Trong quá trình muối dưa, nồng độ NaCl cũng cần có một giá trị thích hợp để

vi khuẩn lactic có sẵn trong dưa phát triển, sinh ra lượng acid lactic cao. Bên cạnh đó, nồng độ NaCl còn phải ức chế được sinh trưởng của những vi khuẩn, nấm mốc gây thối khác để có thể bảo quản dưa muối trong một khoảng thời gian nhất định. Nếu nồng độ muối thấp không đủ để lên men, còn nếu quá cao thì ngược lại dưa sẽ bị mặn không còn độ chua vì các vi khuẩn lactic không sinh trưởng được, do đó nồng độ NaCl là yếu tố quan trọng góp phần vào tạo nên hương vị cho dưa muối [10].

3.3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh acid lactic

Để kiểm tra nhiệt độ thích hợp cho 2 chủng vi khuẩn lactic tuyển chọn có thể sinh trưởng tốt và sinh acid lactic cao, tiến hành nuôi trong môi trường VL lỏng ở các nhiệt độ 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, sau 4 ngày tiến hành định lượng acid lactic. Kết quả của 3 lần lặp lại được trình bày ở Bảng 8.

Kết quả trình bày trong Bảng 8 cho thấy cả 2 chủng L1 và L2 đều sinh acid lactic cao ở nhiệt độ 25-30°C. Hàm lượng acid lactic giảm dần khi nhiệt độ tăng, do vi khuẩn lactic là vi khuẩn ưa ấm sinh trưởng tốt ở nhiệt 28-30°C cũng là nhiệt độ phòng, khi lên men dưa muối ở nhiệt độ 25-30°C là nhiệt độ tương thích để vi khuẩn lactic lên men tốt với điều kiện môi trường, ở quy mô gia đình thì dễ dàng thực hiện lên men dưa muối [2]. Bên cạnh đó, nhiệt độ càng cao càng ức chế khả năng sinh trưởng của vi khuẩn lactic làm cho hàm lượng acid lactic trong dưa muối thấp. Hơn thế, nhiệt độ cao còn thích hợp

Bảng 8. Kết quả khảo sát nhiệt độ (4)

Chủng	25°C	30°C	35°C	40°C
L1	0,064733	0,05745	0,01755	0,0198
L2	0,0642	0,0627	0,034367	0,01875

[1] Kết quả là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại.
Ghi chú: Hàm lượng acid lactic khảo sát với 3 lần lặp lại được kiểm tra ANOVA trong SPSS 16.0 có mức ý nghĩa 95%.

để một số vi khuẩn, nấm mốc phát triển gây thối hoặc hư hỏng dưa dẫn đến làm giảm chất lượng sản phẩm lên men và kéo dài thời gian lên men, ngoài ra nhiệt độ càng cao thì không thể bảo quản lâu được thực phẩm.

4. Kết luận

Qua kết quả khảo sát các nhân tố ảnh hưởng đến khả năng sinh acid lactic của 2 chủng vi khuẩn lactic đã chọn, nhận thấy rằng độ mặn là yếu tố quan trọng trong quá trình lên men lactic. Vì muốn muối dưa ngon thì ngay từ lúc đầu phải ức chế được các vi khuẩn gây thối tạo điều kiện thuận lợi cho vi khuẩn lactic phát triển sinh acid lactic cao từ kết quả khảo sát độ mặn trong khoảng 4-6% là tốt nhất với nhiệt độ khoảng 25-30°C, môi trường có pH 6 là thích hợp lên men trong khoảng 3-4 ngày hàm lượng acid lactic trong dịch lên men đã đạt được 0,06-0,2 g acid với độ chua thích hợp và hương vị dưa muối ngon ■

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Kiều Hữu Ảnh. (2006). *Giáo trình Vi sinh vật học phần 1*, 2. Hà Nội: NXB Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.

2. Lương Đức Phẩm. (2005). *Vi sinh vật học và an toàn vệ sinh thực phẩm*. Hà Nội: NXB Nông nghiệp.

3. Nguyễn Đức Lương. (2004). *Công nghệ vi sinh vật tập 3. Thực phẩm lên men truyền thống*. TP. Hồ Chí Minh: NXB Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh.

4. Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyển & Phạm Văn Ty. (2010). *Vi sinh vật học*. Hà Nội: NXB Giáo dục.

5. Nguyễn Lâm Dũng, Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Thanh Hiền, Lê Đình Lương, Đoàn Xuân Mượu & Phạm Văn Ty. (1978). *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học*. Hà Nội: NXB Khoa học và Kỹ thuật.

6. Nguyễn Thị Diễm Hương & Đỗ Thị Bích Thủy. (2012). Xác định và khảo sát một số tính chất có lợi của chủng *Lactobacillus fermentum* DC1 phân lập từ sản phẩm dưa cải Huế. *Tạp chí khoa học - Trường Đại học Huế*, 71(2), 1-6.

7. Nguyễn Văn Chương. (2008). *Phân lập vi khuẩn Lactobacillus thuần từ tự nhiên để sản xuất lên men chua*. (Đề tài nghiên cứu khoa học không xuất bản). Trường Đại học An Giang.
8. Trần Linh Thuộc. (2007). *Phương pháp phân tích vi sinh vật*. Hà Nội: NXB Giáo dục.
9. Trần Thanh Thủy. (1999). *Hướng dẫn thực hành vi sinh vật học*. TP. Hồ Chí Minh: NXB Giáo dục.
10. Vũ Hồng Thắng. (1998). *Vai trò của nhóm vi khuẩn lactic trong quá trình chế biến nem chua*. (Luận văn tốt nghiệp thạc sĩ không xuất bản). Trường Đại học Bách khoa Hà Nội.
11. William B. Whitman. (2012). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 5: The Actinobacteria. USA: University of Georgia Athen.

Ngày nhận bài: 8/10/2022

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 8/11/2022

Ngày chấp nhận đăng bài: 18/11/2022

Thông tin tác giả:

ThS. KHUU PHƯƠNG YẾN ANH

Bộ môn Sinh - Khoa Sư Phạm

Trường Đại học An Giang - Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

ISOLATING STRAINS OF LACTIC ACID BACTERIA TO USE IN THE PRODUCTION OF PICKLE

● Master. **KHUU PHUONG YEN ANH**

Department of Biology, Department of Pedagogy, An Giang University
Vietnam National University - Ho Chi Minh City

ABSTRACT:

In this study, 12 strains of lactic acid bacteria are isolated from 30 samples of pickles by using the quantitative method of lactic acid presented in fermented juice. In which, two strains with high lactic acid production capacity are selected and identified, namely Strain L1 (0,0045 g) of *Leuconostoc* and strain L2 (0,0063 g) of *Pediococcus*. The study also explores the factors affecting the ability to produce lactic acid of these two strains. The study's results show that these two strains grow well when the salinity ranges from 4 - 6%, the temperature is from 25 - 30°C, the pH is of 6, the fermentation time is from 3 - 4 days. In addition, the fermented juice content of lactic acid should be from 0,06 to 0,2 g to help pickle have a delicious flavor.

Keywords: lactic acid bacteria, pickles, lactic acid, *Leuconostoc*, *Pediococcus*.