

PHÂN LẬP, ĐỊNH DANH VÀ KHẢO SÁT MỘT SỐ TÍNH CHẤT CÓ LỢI CỦA VI KHUẨN LACTIC TỪ TÔM CHUA Ở THỊ XÃ GÒ CÔNG, TỈNH TIỀN GIANG

Isolation, identification and application lactic acid bacteria to “tom chua” in Go Vong town, Tien Giang province

Trương Quốc Tất*, Nguyễn Duy Khánh, Nguyễn Thị Ngọc Thắm,
Nguyễn Thị Thanh Mai, Nguyễn Thị Phương Trang

Khoa Nông nghiệp và Công nghệ thực phẩm – Trường Đại học Tiền Giang, 119 Ấp Bắc, Phường 5,
Thành phố Mỹ Tho, Tiền Giang

* Tác giả liên hệ Trương Quốc Tất (Thư điện tử: truongquoctat@tgu.edu.vn)
(Ngày nhận bài (received): 22-9-2019; Ngày chấp nhận đăng (accepted): 8-10-2019)

Tóm tắt. Mục tiêu của nghiên cứu này là phân lập, định danh và khảo sát một số đặc tính có lợi của các dòng vi khuẩn lactic từ tôm chua ở thị xã Gò Công, tỉnh Tiền Giang. Từ 4 mẫu tôm chua, đã phân lập được 18 dòng vi khuẩn lactic. Khuẩn lạc của chúng có màu trắng sữa hoặc trắng ngà, bìa nguyên hay bìa răng cưa, mô, Gram dương, catalase và oxydase âm tính. Chúng có khả năng sinh acid lactic cao trong môi trường MRS broth có muối ở các nồng độ 0, 4, 6 và 8% (1,12 – 2,19 mg/mL trong 24 giờ nuôi). Trong đó, dòng vi khuẩn GK1 và GH5 có khả năng sinh acid lactic cao hơn các dòng còn lại trong môi trường ở 4 nồng độ muối khác nhau. Trong môi trường khắc nghiệt, dòng vi khuẩn GK1 biểu hiện một số đặc tính probiotic như chịu được pH thấp, dịch dạ dày nhân tạo (pepsin), muối mật. Vì vậy 2 dòng vi khuẩn này đã được định danh với mức tương đồng 99% so với *Lactobacillus farciminis* và *Lactobacillus futsaii* nên 2 dòng vi khuẩn này được gọi lần lượt là *L. farciminis* GK1 và *L. futsaii* GH5. Việc bổ sung nguồn vi khuẩn khởi động vào quá trình lên men tôm chua giúp rút ngắn thời gian lên men (rút ngắn 37,14 % thời gian lên men so với đối chứng). Đánh giá cảm quan cho thấy tôm chua thành phẩm đạt loại khá và đảm bảo các chỉ tiêu vi sinh theo QCVN 8 – 3:2012/BYT.

Từ khóa: tôm chua, vi khuẩn Lactic, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus futsaii*, acid lactic

Abstract. The objective of this study is to isolate, identify and examine several beneficial lactic acid bacteria in “Tom chua” – a lactic product of Go Cong town, Tien Giang province. Eighteen strains of lactic acid bacteria were isolated from four samples. Their colonies are milky white or ivory, whole or serrated, cellular, gram positive and catalase and oxydase negative. They have a high ability to produce lactic acid in broth MRS broth at concentrations of 0, 4, 6 and 8 % (1,12 – 2,19 mg/ mL in 24 hours of culture). In particular, bacteria strains GK1 and GH5 are more likely to produce lactic acid than the remaining strains in the environment at the four salt concentrations. In to harsh environments, the GK1 bacterial strain exhibits several probiotic properties such as resistance to low pH, pepsin and bile salts. These two strains were identified as *L. farciminis* GK1 and *L. futsaii* GH5 because they are 99%

homologous to *Lactobacillus farciminis* and *Lactobacillus futsaii*. The addition of bacterial starter to sour shrimp fermentation helps to shorten fermentation time (37.14 % compared with the control). The sensory evaluation shows that the product is over average quality and meets microbiological criteria according to QCVN 8 - 3: 2012 / BYT.

Keywords: Tom chua, Lactic bacteria, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus futsaii*, lactic acid.

1 Mở đầu

“Tom chua” hay “Mắm tép” là tên gọi dân gian của dạng sản phẩm tôm tươi lên men lactic. Tôm tươi được phối trộn cùng với muối, nước mắm, đường, bột nếp, rượu, thính, riềng, tỏi, ớt và được lên men tự nhiên ở 28 - 30 °C trong khoảng 15 - 20 ngày. Đây là một món ăn truyền thống và được phổ biến trên cả nước. Tuy có một số khác biệt về nguyên liệu và phương pháp lên men, nhưng về bản chất tôm chua vẫn là một sản phẩm của quá trình lên men lactic và thủy phân protein. Từ xưa, vi khuẩn lactic đã được ứng dụng rộng rãi trong các sản phẩm lên men truyền thống. Mặc dù tôm chua là một loại đặc sản, nhưng trong thời gian qua sản phẩm này vẫn chưa được nghiên cứu nhiều để cải tiến quy trình sản xuất, nâng cao chất lượng của thành phẩm. Quá trình lên men không chỉ làm tăng giá trị cảm quan mà còn tăng giá trị dinh dưỡng cho sản phẩm. Tuy nhiên, quá trình sản xuất tôm chua hiện nay vẫn mang tính truyền thống nên vẫn còn nhiều nhược điểm và phụ thuộc vào nhiều yếu tố. Một trong những yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm (mùi, vị, màu sắc tự nhiên, v.v.) chính là nguồn vi khuẩn lactic có trong nguyên liệu. Vì vậy, việc phân lập và xác định loài vi khuẩn lactic dựa trên đặc điểm về hình thái, đặc điểm hóa sinh và sinh học phân tử (giải trình tự gen) là rất cần thiết để làm cơ sở cho các nghiên cứu cải tiến quy trình chế biến tôm chua (chúng vi khuẩn khởi động bổ sung vào nguyên liệu). Chính vì những lý do trên nên nghiên cứu này đã được thực hiện với mục tiêu tuyển chọn và định danh các dòng vi khuẩn lactic có khả năng sinh acid, chịu mặn và có tiềm năng probiotic, đồng thời ứng dụng dòng vi khuẩn tối ưu để thử nghiệm lên men tôm chua.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu

Mẫu phân lập: Bốn mẫu tôm chua thành phẩm đã được thu mua ở chợ và các cơ sở sản xuất tôm chua tại Thị xã Gò Công, tỉnh Tiền Giang.

Hóa chất: Môi trường MRS broth (Ấn Độ), Agar (Merck), CaCO₃ (Trung Quốc), KOH (Trung Quốc), H₂O₂ (Trung Quốc), NaOH 0,1 N (Trung Quốc), phenolphthalein (Trung Quốc); Hóa chất cho thực hiện phản ứng PCR: Sử dụng các hóa chất trong bộ kit PCR, bao gồm: Go Taq Green Master Mix 2X của Promega, cặp primer 27F/1492R. Hóa chất dùng cho điện di sản phẩm PCR: Agarose 1 - 1,5% (Merck), TAE buffer 1X, loading buffer (Bio-Rad), Ethidium bromide (chất chỉ thị huỳnh quang-EtBr), 1kb DNA ladder (Promega).

2.2 Phân lập vi khuẩn lactic từ tôm chua

Xử lý mẫu

Mỗi mẫu tôm chua được xay mịn, trộn đều và cân 10 g (nước và cái) cho vào các bình tam giác chứa 90 mL nước cất đã khử trùng, lắc 150 vòng/phút ở 37 °C trong 1,5 giờ. Hút 1 mL dịch tôm chua đã lắc cho vào 100 mL môi trường MRS broth đã khử trùng, lắc 150 vòng/phút ở 37 °C trong 48 giờ.

Phân lập vi khuẩn lactic

Pha loãng các mẫu đã tăng sinh tới các nồng độ pha loãng 10^{-1} , 10^{-2} , ..., 10^{-6} , 10^{-7} . Hút 0,1 mL mẫu đã pha loãng ở các nồng độ 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} cho vào đĩa Petri chứa MRS agar có 0,85 % CaCO_3 , tiến hành trang mẫu, ủ ở 37 °C trong 48 giờ. Chọn các khuẩn lạc tiêu biểu làm tan CaCO_3 (vòng halo) cấy chuyển nhiều lần trên môi trường MRS agar cho đến khi được khuẩn lạc đồng nhất. Kiểm tra độ thuần cùng với một số đặc điểm hình thái khuẩn lạc của các dòng vi khuẩn sau 48 giờ nuôi và kiểm tra một số đặc tính hóa sinh để khẳng định sơ bộ chúng thuộc vi khuẩn lactic [1]. Các dòng vi khuẩn lactic được trữ giống trong ống thạch nghiêng và trong dung dịch glycerol 30 % ở - 20 °C.

2.3 Kiểm tra hình thái khuẩn lạc đặc trưng và kiểm tra các đặc tính sinh hóa tiêu biểu

Đặc điểm nhận dạng khuẩn lạc: những dòng vi khuẩn được chấp nhận khi khuẩn lạc có vòng halo xung quanh, có dạng bìa nguyên hoặc răng cưa, màu trắng sữa cho đến trắng ngà, độ nổi lồi hoặc mô. Các khuẩn lạc phải nằm trên các đường cấy chuyển, không bị lẫn bởi các vi khuẩn có đặc điểm lạ nào khác. Sau khi được tách rỗng, các dòng vi khuẩn được quan sát dưới kính hiển vi điện tử. Khi hình dạng tế bào vi khuẩn tương đồng thì vi khuẩn phân lập đã thuần.

Sau khi đã phân lập, các dòng vi khuẩn tiêu biểu được xác định bằng các thử nghiệm hóa sinh: xác định Gram, thử nghiệm catalase và thử nghiệm oxydase.

2.4 Đánh giá khả năng sinh acid của các dòng vi khuẩn lactic phân lập ở các nồng độ muối khác nhau

Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên gồm 72 nghiệm thức với 2 nhân tố: dòng vi khuẩn (không bổ sung vi khuẩn hoặc bổ sung dòng đơn trong 18 dòng: GK1, GK2, GK3, GH1, GH2, GH3, GH4, GH5, GH6, GH7, BH1, BH2, CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6 và 4 nồng độ muối NaCl (0, 4, 6 và 8%), mỗi nghiệm thức có 3 lần lặp lại. Mỗi dòng vi khuẩn được nuôi trong 15 mL môi trường MRS broth, lắc 150 vòng/phút, ở 37 °C trong 24 giờ. Hàm lượng acid lactic tạo ra của các dòng vi khuẩn đã phân lập được xác định theo phương pháp chuẩn độ Therner.

Xác định nồng độ acid

Lấy toàn bộ 15 mL dịch vi khuẩn sau 24 giờ nuôi, đem ly tâm. Sau đó hút 10 mL dịch trong cho vào bình tam giác, bổ sung 20 mL nước cất và 1 - 2 giọt phenolphthalein nồng độ 1 % trong cồn 90 %. Chuẩn độ bằng NaOH 0,1 N đến khi xuất hiện màu hồng nhạt bền trong 30 giây, ghi lại thể tích NaOH đã dùng để chuẩn độ.

Độ acid được tính theo độ Therner.

$$^{\circ}T = V_{\text{NaOH}} \text{ tiêu tốn} \times 10$$

$$\% \text{ acid lactic} = ^{\circ}T \times 0,009$$

trong đó: $^{\circ}T$ là độ Therner, 1 $^{\circ}T$ tương ứng với 9 mg acid lactic.

2.5 Đánh giá khả năng chống chịu các điều kiện bất lợi của môi trường bao gồm pH thấp, dịch dạ dày nhân tạo (pepsin) và muối mật của dòng vi khuẩn sinh acid lactic cao nhất đã phân lập

Thực hiện đánh giá một số đặc tính có lợi của dòng vi khuẩn sinh acid lactic cao nhất GK1 bao gồm khả năng chống chịu trong điều kiện bất lợi như pH thấp (pH = 2, 3 và 7), dịch dạ dày nhân tạo (0, 0,20 và 0,30 % pepsin), muối mật (0, 0,30 và 0,60 % muối mật), nhằm đánh giá bước đầu dòng vi khuẩn này có thể sống và tồn tại trong hệ tiêu hóa của con người hay không. Các thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp của [2,3].

Định danh các dòng vi khuẩn lactic đã tuyển chọn

DNA của dòng vi khuẩn GK1 và GH5 có khả năng sinh acid lactic và chịu mặn cao được tách chiết theo quy trình sau: Cân 0,45 gram cát mịn sạch, đã tiệt trùng cho vào các ống eppendorf 1,5 mL; lấy 8 - 10 khuẩn lạc đã thuần từ đĩa môi trường TSA cho vào ống eppendorf; cho 1 mL CTAB 3% vào mỗi ống eppendorf, trộn đều hỗn hợp khuẩn lạc và cát trong dung dịch Cetyltrimethylammonium bromua; lắc đều các ống eppendorf sau đó đem ủ ở 65 °C trong 1 - 2 giờ, cách 15 phút lắc đều các ống eppendorf để mẫu nóng đều; ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 10 phút; chuyển 700 μ L dịch trong bên trên cho sang ống eppendorf 1,5 mL mới; cho thêm 500 μ L chloroform vào 700 μ L dịch trong vừa chuyển và lắc nhanh để tăng sự tiếp xúc của mẫu và chloroform; ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 8 phút; chuyển 500 μ L dịch trong bên trên sang ống eppendorf 1,5 mL mới; kết tủa DNA bằng 750 μ L isopropanol lạnh, giữ lạnh trong 30 phút; ly tâm mẫu ở tốc độ 13000 vòng/phút trong 30 phút; loại bỏ isopropanol cẩn thận, tránh làm trôi DNA; làm sạch DNA bằng 200 μ L ethanol lạnh; ly tâm ở tốc độ 6.500 vòng/phút trong 5 phút; loại bỏ ethanol và để khô mẫu qua đêm; cho thêm 30-100 μ L TE vào để trữ mẫu và cho vào tủ đông ở - 20 °C [4].

Sau đó, sản phẩm DNA được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi 27F/1492R có trình tự: 27F (5'-3'): AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG' và 1492R (5' - 3'): TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT. Hai đoạn mồi này nhắm vào đoạn gene 16S rRNA của vi khuẩn. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR: giai đoạn sơ khởi 95 °C (300 giây); 30 chu kì: 95 °C (60 giây) - 53 °C (30 giây) - 72 °C (90 giây) - 72 °C (300 giây). Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1,5 % trước khi giải trình tự. Kết quả giải trình tự được so sánh và dò tìm trên ngân hàng gene NCBI (trang web <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) để xác định mức độ loài của 2 dòng vi khuẩn.

2.7 Thử nghiệm lên men tôm chua bằng các dòng vi khuẩn lactic đã phân lập

Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm đánh giá khả năng lên men tôm chua có bổ sung các dòng vi khuẩn lactic đã phân lập như nguồn vi khuẩn khởi động ban đầu được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 3 nghiệm thức với 4 lần lặp lại (100 g

tôm/lần), có 1 nhân tố: vi khuẩn (không bổ sung vi khuẩn, chỉ bổ sung dòng vi khuẩn GK1, bổ sung tổ hợp 3 dòng vi khuẩn GK1, GK2, GK3), đường (7 %) (w/w) và bổ sung đu đủ (10 g).

Chuẩn bị dịch vi khuẩn: 3 dòng vi khuẩn lactic được nuôi tăng sinh đến cấp 2 trong MRS broth. Sinh khối vi khuẩn lactic được thu nhận bằng phương pháp ly tâm dịch tăng sinh (6000 vòng/phút, 5 phút, 4°C) và được rửa 3 lần để loại bỏ thành phần môi trường tăng sinh. Sinh khối vi khuẩn lactic sau khi rửa sạch được pha loãng để OD đạt 0,7.

Chuẩn bị dịch gia vị: dịch gia vị bao gồm muối ăn (6 %) (w/w), đường cát (7 %) (w/w) và nước mắm. Gia vị được đun nóng rồi để nguội.

Chuẩn bị tôm: tôm thí nghiệm là loại tôm đất còn tươi, được bỏ đầu và rửa sạch, sau đó ngâm nước muối (20 %) trong 12 giờ. Tôm sau khi ngâm nước muối được xóc rượu trắng 40 %.

Xếp hộp: 100 g tôm được xếp hộp kèm với tỏi ớt đã thái lát, rót 50 mL dịch gia vị đã nguội và bổ sung 5 mL vi khuẩn khởi động. Tất cả nguyên liệu được gài nén kỹ để đảm bảo yếm khí, quá trình lên men kéo dài 10 - 12 ngày và đạt yêu cầu khi pH đạt 3,80 - 4,00.

Chỉ tiêu theo dõi

pH của dịch lên men lactic ở các thời điểm: 0 ngày, 3 ngày, 6 ngày, 9 ngày, 12 ngày và hàm lượng acid lactic sinh ra ở ngày 12. Mật số vi khuẩn lactic ở thời điểm 1 ngày sau khi bổ sung vào nguyên liệu và thời điểm sau 12 ngày. Đánh giá cảm quan của tôm chua thành phẩm (màu sắc, hương vị, cấu trúc sản phẩm) bằng phương pháp cho điểm theo TCVN 3215 - 79.

Phân tích và xử lý số liệu

Số liệu đã được nhập bằng phần mềm Excel và xử lý thống kê bằng phần mềm Minitab 16.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Phân lập và làm thuần các dòng vi khuẩn lactic

Từ 4 mẫu tôm chua thu mua ở Thị xã Gò Công, Tỉnh Tiền Giang đã phân lập và tuyển chọn được 18 dòng vi khuẩn lactic trên môi trường MRS agar có bổ sung CaCO_3 0,85 %. Mười tám dòng vi khuẩn được tuyển chọn là những dòng vi khuẩn có khả năng sinh acid làm tan CaCO_3 trong môi trường thạch, tạo vòng trong xung quanh khuẩn lạc (vòng halo). Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của 18 dòng vi khuẩn sau 2 - 3 ngày nuôi cấy được trình bày ở Hình 1.



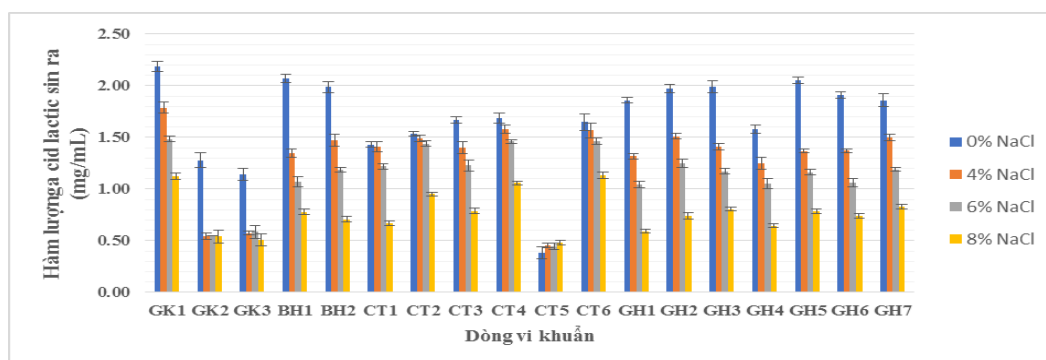
Hình 1. Vi khuẩn lactic sau 48 giờ nuôi cấy A. Quần xã vi khuẩn; B. Dòng vi khuẩn

Quan sát tiêu bản vi khuẩn dưới kính hiển vi điện tử cho thấy tất cả 18 dòng vi khuẩn được phân lập đều có khuẩn lạc tròn, màu trắng sữa (dòng GK1, GH1, GH2, GH3, GH4, GH5, GH6, GH7, BH1, BH2), màu trắng ngà (dòng CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6). Tất cả các dòng đều có bìa nguyên ngoại trừ dòng GK2, GK3, BH1 và BH2 có bìa răng cưa. Cả 18 dòng vi khuẩn đều có Gram dương, catalase và oxydase âm tính. Về hình dạng tế bào, hầu hết hình dạng tế bào của các dòng vi khuẩn đã phân lập có hình que ngắn ngoại trừ dòng GK2 có hình que dài (Hình 1). Đây cũng là những đặc điểm nổi bật về kiểu hình của vi khuẩn lactic mà [5] đã mô tả.

3.2 Khả năng sinh acid lactic của các dòng vi khuẩn đã phân lập ở các nồng độ muối khác nhau

Trong quá trình sản xuất tôm chua thường bổ sung muối với nồng độ cao nhằm ức chế vi khuẩn gây thối và điều chỉnh tốc độ lên men vừa phải để tạo hương vị đặc trưng cho sản phẩm. Vì vậy, những dòng vi khuẩn được phân lập từ mẫu tôm chua đều có khả năng chịu mặn. Khả năng chịu mặn của các dòng vi khuẩn được đánh giá bằng cách nuôi trong môi trường MRS lỏng có bổ sung muối NaCl ở các nồng độ 0, 4, 6 và 8%. Khả năng sinh acid lactic của các dòng vi khuẩn đã phân lập ở 4 nồng độ muối khác nhau sau 24 giờ nuôi được xác định bằng phương pháp chuẩn độ Therner. Kết quả về khả năng sinh acid lactic của các dòng vi khuẩn trong môi trường MRS broth được thể hiện qua Hình 2.

Có thể nhận thấy tất cả 18 dòng khuẩn đều có khả năng sống sót, tăng trưởng và sinh acid lactic trong môi trường MRS broth có bổ sung NaCl với nồng độ 0, 4, 6 và 8% (0,38 - 2,19 mg/mL). Trong đó dòng GK1 sinh lượng acid cao nhất ở tất cả các nồng độ muối (1,13 - 2,19 mg/mL). Sự giảm lượng acid hình thành khi tăng nồng độ muối diễn ra ở tất cả các dòng vi khuẩn ngoại trừ dòng CT5. Mặc dù dòng CT5 sản xuất lượng acid lactic ít nhất (0,38 - 0,48 mg/mL) nhưng lượng acid hình thành lại có độ biến động thấp khi tăng nồng độ muối chứng tỏ dòng vi khuẩn CT5 có khả năng chịu mặn tốt. Lượng acid lactic hình thành từ các dòng vi khuẩn đã được phân lập trong nghiên cứu này cũng tương đương với hàm lượng acid lactic hình thành từ các vi khuẩn trong các nghiên cứu khác [6], [7]. Đồng thời, hàm lượng acid lactic hình thành từ dòng GK2, GK3 và CT5 đều thấp ở cả 3 nồng độ muối. Từ các kết quả thí nghiệm cho thấy sự gia tăng nồng độ muối tỷ lệ nghịch với lượng acid lactic sinh ra, dòng vi khuẩn GK1 có khả năng tham gia tốt vào quá trình lên men lactic, sản xuất các sản phẩm lên men chua kể cả những sản phẩm có sử dụng muối ở nồng độ cao. Do đó, dòng vi khuẩn lactic GK1 là dòng vi khuẩn ưu việt để đưa vào thử nghiệm lên men tôm chua.

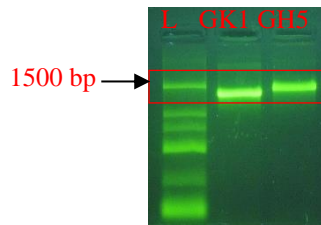


Hình 2. Hàm lượng acid lactic trung bình được sinh ra từ các dòng vi khuẩn ở các nồng độ muối khác nhau

3.3 Kết quả chạy PCR, điện di, giải trình tự và định danh dòng vi khuẩn lactic GK1 và GH5

DNA của dòng vi khuẩn GK1, GH5 được trích và thực hiện PCR với cặp mồi tổng quát 27F-1492R nhằm vào đoạn gene 16S-rRNA. Bộ gen của vi khuẩn đã được trích ly thành công với sản phẩm PCR thu được có chất lượng tốt, bằng rõ duy nhất cho mỗi dòng vi khuẩn trên gel điện di với kích thước đoạn gen lần lượt là 1458 bp và 1542 bp (Hình 3).

Sản phẩm PCR của dòng vi khuẩn GK1 và GH5 được giải mã trình tự và định danh dựa trên sự kết hợp các đặc điểm hóa sinh và so sánh trình tự nucleotide trong gene 16S-rRNA của dòng vi khuẩn GK1 và GH5 với gene tương ứng trên cơ sở dữ liệu NCBI bằng BlastN. Kết quả cho thấy dòng GK1 và GH5 có trình tự nucleotide của gene 16S-rRNA tương đồng 99% lần lượt với gene của dòng *Lactobacillus farciminis* (số đăng ký: NR117813.1) và *Lactobacillus futsaii* (số đăng ký: NR117973.1). Nên dòng GK1 và GH5 được gọi lần lượt là *L. farciminis* GK1 và *L. futsaii* GH5.



Hình 3. Điện di sản phẩm PCR của dòng vi khuẩn GK1 và GH5
Chú thích: L: thang chuẩn; GK1: dòng vi khuẩn GK1; GH5: dòng vi khuẩn GH5

Dòng	Trình tự gen 16S-RNA
GK1	GGGGTGCTAATACATGCAAGTCGAACGAACCATCCTGAAGATTGAAGCTTGCTTCAT GATTCAGATCTTGGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCAA AGTGGGGGATAACATTTGGAAACAAGTGCTAATACCGCATAACAACACTTTTCACAT GATCGTAGCTTAAAAGATGGCTCTGCTATCACTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAG CTAGTTGGTGAGGTAATAGCTCACCAAGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGT AATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG GGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAATGCCGCGTGAGTGAAGAAG GTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTGAAGAAGAACATGCGTGAGAGTAACTGTTCA CGTACTGACGGTATTCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT AATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGAGAATGTAGGCGG TTTATTAAGTTTGAAGTGAAAGCCCTCGGCTCAACCGAGGAAGTGCTTCGAAAACCTG GTAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGT AGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGTCTGTANCTGACGCTG ANATCGAAGCATGGGNGCAACAGGATANAACCTGGNNTCATGCCGAACNNGATG CTAGGGTGAAGGTT
GH5	CATGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACCAAACCTGTTGATTAAAGCTTGCTTTATG ATTCAGACCTNNNTAAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCAA

```
AGTGGGGGATAACATTTGGAAACAAGTGCTAATACCGCATAACAACACTTTTCACAT
GATCGTAGCTTGAAAGATGGCAAGGCTATCACTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTA
GCTAGTTGGTGAGGTAATAGCTCACCAAGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGG
GTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGT
AGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAATGCCGCGTGAGTGAAGA
AGGTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTGAATAAGAACATGCGTGAGAGTAACTGTT
CACGTA CTGACGGTATTCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGAATGTAGG
CGGTCTATTAAGTTTGAAGTGAAAGCCCTCGGCTCAACCGAGGAAGTGCTTCGAAAA
CTGTTAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAANNTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGGAAT
```

Kết quả định danh dòng vi khuẩn *L. farciminis* GK1 tương tự kết quả nghiên cứu định danh các dòng vi khuẩn lactic trong sản phẩm mắm chua cá sặc [8]. Nhóm tác giả này cũng đã định danh được dòng vi khuẩn *L. farciminis* từ sản phẩm mắm chua cá sặc.

Kết quả định danh dòng vi khuẩn *L. futsaii* GH5 tương tự với kết quả nghiên cứu [9] đã định danh dòng vi khuẩn *L. futsaii* từ sản phẩm Kung-som - một món ăn lên men chua tôm biển truyền thống của Thái Lan và kết luận *L. futsaii* có khả năng probiotic và sinh nhiều gamma aminobutyric acid, có tiềm năng đưa vào sản xuất các sản phẩm thực phẩm chức năng.

3.4 Khảo sát khả năng chống chịu các điều kiện bất lợi của môi trường như pH thấp, dịch dạ dày và muối mật của các dòng vi khuẩn lactic đã phân lập

Dòng vi khuẩn GK1 có khả năng sống sót trong các điều kiện khắc nghiệt như môi trường pH thấp, dịch dạ dày nhân tạo, muối mật cao. GK1 có khả năng sống sót sau 3 giờ ở môi trường 0,20 % pepsin với mật số đạt được là $5,21 \pm 0,03$ log CFU/mL với tỷ lệ là 79,26 % so với mật số ban đầu ($6,57 \pm 0,02$ log CFU/mL) và ở môi trường 0,30 % pepsin đạt mật số là $5,03 \pm 0,03$ log CFU/ mL với tỷ lệ sống đạt 76,56 % so với mật số ban đầu. Dòng GK1 có khả năng sống sót sau 3 giờ ở môi trường pH = 3 mật số đạt $5,15 \pm 0,02$ log CFU/mL tương ứng tỷ lệ là 78,39 % so với mật độ ban đầu và ở pH = 2 chủng vi khuẩn vẫn có khả năng trú ngụ được với mật độ đạt $4,61 \pm 0,04$ tương ứng tỷ lệ sống là 70,17 % so với ban đầu. Tương tự, dòng GK1 tồn tại được sau 3 giờ trong môi trường 0,30% muối mật với mật độ đạt $5,98 \pm 0,08$ log CFU/ mL tương ứng tỷ lệ 91,02 % so với ban đầu và 0,60 % muối mật với mật độ đạt $5,62 \pm 0,10$ log CFU/ mL tương ứng tỷ lệ 85,54 % so với ban đầu.

3.5 Thử nghiệm lên men tôm chua bằng các dòng vi khuẩn lactic đã phân lập

Khả năng lên men của các dòng vi khuẩn được thể hiện thông qua độ giảm pH tại các thời điểm ngày 1, 3, 6, 9 và 12 (Hình 4A) và lượng acid lactic sinh ra sau 12 ngày (Hình 4B).

Các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn có tốc độ giảm pH nhanh và hàm lượng acid lactic sinh ra cao hơn so với mẫu đối chứng không bổ sung vi khuẩn. Đặc biệt nghiệm thức TC3 (tổ hợp 3 dòng vi khuẩn GK1, GK2, GK3) có tốc độ giảm pH nhanh nhất. Giá trị pH trung bình bằng 3,93 vào ngày thứ 10 và hàm lượng acid lactic đạt cao nhất (3,80 mg/ mL) vào ngày thứ 12, giá trị pH và hàm lượng acid lactic hình thành

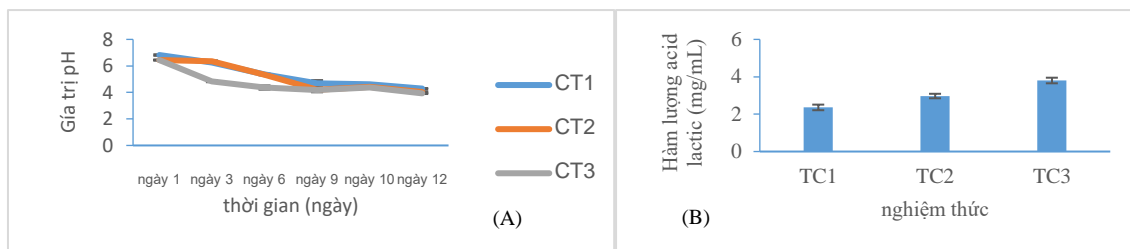
của nghiệm thức TC3 có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các mẫu đối chứng (TC1) và mẫu bổ sung dòng vi khuẩn GK1 (TC2).

Trong 6 đến 9 ngày đầu của quá trình lên men, pH của dung dịch lên men giảm nhanh từ khoảng 6,64 xuống 4,28. Sau đó đến ngày thứ 10, pH tăng nhẹ và giảm chậm trong thời gian lên men sau đó. Hiện tượng này cũng được ghi nhận tương tự trong kết quả nghiên cứu [10].

Thời gian lên men kết thúc của các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn là 10 - 12 ngày và của các nghiệm thức đối chứng là 15 - 20 ngày. Qua đó, việc bổ sung giống vi khuẩn khởi động có tác dụng thúc đẩy và ổn định quá trình lên men (biểu hiện qua sự gia tăng mật số vi khuẩn lactic) (Bảng 1), hạn chế các vi khuẩn có hại *E. coli* và *Salmonella*. Điều này cho thấy giống vi khuẩn khởi động có tác dụng làm tăng chất lượng và đảm bảo các chỉ tiêu vi sinh của tôm chua thành phẩm.

Kết quả phân tích mật số vi khuẩn lactic trong sản phẩm tôm chua phù hợp với một nghiên cứu về mật số vi khuẩn lactic trong sản phẩm cá lên men của Thái Lan dao động từ 10^7 đến 10^{11} CFU/g [11].

Kết quả kiểm nghiệm *E. coli* và *Salmonella* của các mẫu tôm chua thành phẩm cho kết quả âm tính (xem Hình 5).

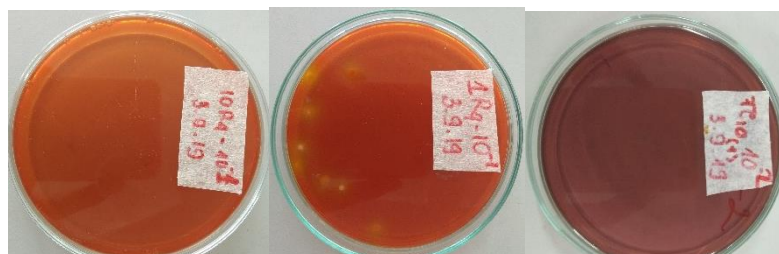


Hình 4. Độ giảm pH (A) và lượng acid lactic sinh ra (B)

Ghi chú: TC1: không bổ sung vi khuẩn; TC2: vi khuẩn GK1; TC3: tổ hợp vi khuẩn GK1, GK2, GK3

Bảng 1. Mật số vi khuẩn lactic ở các nghiệm thức

Nghiệm thức	Mật số Log (CFU/ g)	
	Ngày 0	Ngày 12
TC1	$3,56^c \pm 0,07$	$6,56^c \pm 0,10$
TC2	$5,50^b \pm 0,03$	$8,52^b \pm 0,03$
TC3	$5,69^a \pm 0,02$	$9,56^a \pm 0,02$



Hình 5. Kết quả kiểm nghiệm *E. coli* và *Salmonella*

Theo [12] với các sản phẩm lên men được sử dụng không đun nấu thì để đảm bảo an toàn cho người sử dụng đối với mối nguy vi sinh vật gây bệnh và vi sinh vật gây hư hỏng thì đòi hỏi pH của sản phẩm phải thấp hơn 4,60 [12]. Như vậy, kể cả mẫu đối chứng và mẫu bổ sung vi khuẩn lactic đều thỏa mãn yêu cầu này. Do đó, tôm chua là sản phẩm có giá trị pH nằm trong ngưỡng pH đảm bảo an toàn về mối nguy vi sinh vật gây bệnh.

3.7 Đánh giá cảm quan sản phẩm

pH, mật số VK lactic và hàm lượng acid lactic sinh ra cho thấy nghiệm thức TC3 khác biệt có ý nghĩa thống kê so với 2 nghiệm thức còn lại. Tính chất cảm quan của tôm chua thành phẩm được đánh giá bằng phương pháp cho điểm thông qua bảng mô tả và trọng số theo TCVN 3215-79. Bảng mô tả và trọng số được xây dựng dựa trên nguyên tắc giá trị và nguyên tắc chuyên gia. Kết quả đánh giá chất lượng sản phẩm tôm chua được thể hiện qua (Bảng 2).



Hình 6. Tôm chua thành phẩm

Bảng 2. Kết quả đánh giá chất lượng tôm chua thành phẩm

Chỉ tiêu	Điểm trung bình			Trọng số	Điểm có trọng lượng		
	TC1	TC2	TC3		TC1	TC2	TC3
Màu	3,57 ^b ± 0,67	3,90 ^{ab} ± 0,71	4,15 ^a ± 0,58	0,80	2,86 ^b ± 0,67	3,12 ^{ab} ± 0,71	3,32 ^a ± 0,58
Mùi	3,47 ^b ± 0,60	3,75 ^{ab} ± 0,71	4,10 ^a ± 0,64	1,20	4,16 ^b ± 0,60	4,50 ^{ab} ± 0,71	4,92 ^a ± 0,64
Vị	3,52 ^b ± 0,60	4,00 ^{ab} ± 0,64	4,05 ^a ± 0,68	1,20	4,22 ^b ± 0,60	4,80 ^{ab} ± 0,64	4,86 ^a ± 0,68
Cấu trúc	3,57 ^b ± 0,59	3,65 ^{ab} ± 0,67	4,10 ^a ± 0,64	0,80	2,86 ^b ± 0,59	2,92 ^{ab} ± 0,67	3,28 ^a ± 0,64
	Tổng điểm				14,1 ^b ± 2,46	15,34 ^{ab} ± 2,73	16,38 ^a ± 2,54
	Xếp loại				Trung bình	Khá	Khá

4 Kết luận

Mười tám dòng vi khuẩn lactic có khả năng sinh acid lactic và chịu mặn ở nồng độ 4 – 8 % đã được phân lập. Dòng vi khuẩn GK1 có khả năng sinh acid lactic cao nhất, chịu mặn tốt nhất, có một số đặc tính probiotic như chịu pH thấp (pH 2 và 3), chịu pepsin (0,20 và 0,30 %), chịu muối mật (0,30 và 0,60 %), đã được định danh là *L. farcimicis* GK1. Việc bổ sung giống vi khuẩn khởi động đã phân lập có tác dụng rút ngắn thời gian lên men (giảm 37,14 % thời gian lên men) và tạo ra sản phẩm tôm chua có hương vị thơm ngon và đảm bảo các chỉ tiêu vi sinh thực phẩm.

Lời cảm ơn: Kinh phí thực hiện nghiên cứu này được cung cấp bởi Trường Đại học Tiền Giang

Tài liệu tham khảo

1. Axelsson L. Acid lactic Bacteria: Classification and Physiology. Acid lactic Bacteria microbiological and Functional Aspects. Third Edition, Revised and Expanded MATFORSK, Norwegian Food Research Institute, A^os, Norway. 2004;19-67. <https://doi.org/10.1201/9780824752033.ch1>
2. Duc LH, Hong HA, Barbosa TM, Henriques AO, Cutting SM. Characterization of Bacillus Probiotics Available for Human Use. Applied and Environmental Microbiology. 2004 04 01;70(4):2161-2171. <https://doi.org/10.1128/aem.70.4.2161-2171.2004>
3. Tính QĐ, Trung TT, Duy NN, Hương NT. Khảo sát một số hoạt tính probiotic của Kefir chanh dây truyền thống và Kefir chanh dây bổ sung Lactobacillus casei VTCC186, Science & Technology Development. 2013;40-47. <http://www.vjol.info/index.php/JSTD/article/download/15473/13890>
4. Ihrmark KTM, Inga KCM, Bödeker F, Hanna K, Ariana S, Jessica S, Ylva S, Jan BD, Mikael EC, Karina, Björn DL. New primers to amplify the fungal ITS2 region - evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1574 - 6941.2012.01437.x>
5. Kandler O, Weiss N. In: Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology, Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG. Baltimore: Williams and Wilkins. 1986;(2):1208-1234. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Paukatong%20KV%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=11570169
6. Hằng NTM, Thư NM. Phân lập và tuyển chọn một số vi khuẩn lactic có khả năng sinh tổng hợp amylase và bacteriocin. Tạp chí Công nghệ sinh học và Giống cây trồng số 3. 2013;3-10. <http://vnuf.edu.vn/documents/454250/1795973/1.Nguyen%20Thi%20Minh%20Hang.8%20trang.pdf>
7. Huỳnh VV. Phân lập và định danh vi khuẩn lactic lên men nem chua tỉnh Đồng Tháp và Thành phố Cần Thơ, Luận văn Thạc sỹ. Trường Đại Học Cần Thơ. 2012. <https://123doc.org//document/2300335-luan-van-thac-si-cong-nghe-sinh-hoc-phan-lap-va-dinh-danh-vi-khuan-lactic-len-men-nem-chuatinh-dong-thap-va-thanh-pho-can-tho.htm>
8. Nhung NTT, Thành NV, Hiệp NH. Định danh và xác định một số đặc tính sinh hóa của các dòng vi khuẩn lactic trong sản phẩm mắm chua cá sặc. 2014;53-60. <https://sj.ctu.edu.vn/ql/docgia/tacgia-9970/baibao-2904/doi-ctu.jvn.2014.197.html>
9. Sanchart C, Benjakul S, Rattanaporn O, Haltrich D, Maneerat S. Efficiency of the V3 region of 16S rDNA and the rpoB gene for bacterial community detection in Thai traditional fermented shrimp (Kung-Som) using PCR-DGGE techniques. 2015;291-297. <https://www.researchgate.net/publication/282710669>
10. Nhung NTT, Thành NV, Hiệp NH. Nghiên cứu bổ sung giống vi khuẩn lactic trong chế biến sản phẩm mắm chua cá sặc. 2014;9-16. [http://sj.ctu.edu.vn/ql/docgia/download/baibao-2904/07-CNSH-DO%20THI%20TUYET%20NHUNG\(53-60\).pdf](http://sj.ctu.edu.vn/ql/docgia/download/baibao-2904/07-CNSH-DO%20THI%20TUYET%20NHUNG(53-60).pdf)

11. Tanasupawat S, Okada S, Komagata K. Lactic acid bacteria found in fermented fish in Thailand. *J. Gen. Appl. Microbiol* 44. 1998;193-200. <https://doi.org/10.2323/jgam.44.193>
12. Paukatong K, Kunawasen S. The hazard analysis and critical control points (HACCP) generic model for the production of Thai fermented pork sausage (Nham). 2001;327-330. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11570169>