

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VI KHUẨN LACTIC ĐỂ ỨNG DỤNG TRONG SẢN XUẤT ĐỒ UỐNG PROBIOTIC TỪ GỪNG

Vũ Quỳnh Hương, Vũ Thị Yến, Nguyễn Thị Thanh Thủy*

Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: nttthuycentp@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 28.09.2022

Ngày chấp nhận đăng: 20.12.2022

TÓM TẮT

Vi khuẩn lactic đóng vai trò quan trọng trong sản xuất thực phẩm lên men. Mục đích của nghiên cứu là phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic từ sản phẩm lên men để ứng dụng trong sản xuất đồ uống probiotic từ gừng. Kết quả phân lập trên môi trường MRS được 46 chủng vi khuẩn với kích thước 1-1,5mm, khuẩn lạc tròn, bóng, màu trắng đục hoặc trắng sữa, mô nổi. Sáu chủng được sơ tuyển dựa trên đặc điểm Gram dương, catalase âm và đặc điểm hình thái tế bào hình que hoặc hình cầu. Định danh bằng phương pháp khối phổ MALDI-TOF xác định được các chủng trên thuộc 4 loài *Enterococcus faecium*, *Enterococcus casseliflavus*, *Lactobacillus fermentum* và *Lactobacillus plantarum*. Thử nghiệm hoạt tính probiotic, tuyển chọn được chủng *L. plantarum* SM1.3 có khả năng chịu được pH 1,0-3,0, chịu muối mật 0,3% tốt, có khả năng sinh enzyme amylase, protease, cellulase và kháng hai chủng vi sinh vật kiểm định *E. coli* và *Salmonella* sp. Kết quả giải trình tự gen cho thấy chủng SM1.2 thuộc loài *Limosilactobacillus fermentum* và chủng SM1.3 thuộc loài *Lactiplantibacillus plantarum*. Bước đầu sử dụng chủng vi khuẩn *L. plantarum* SM 1.3 cho sản xuất đồ uống probiotic từ gừng thu được sản phẩm có chất lượng cảm quan xếp loại tốt, mật độ vi khuẩn *L. plantarum* SM1.3 đạt yêu cầu đối với sản phẩm lên men sau 5 ngày bảo quản ở điều kiện 4°C.

Từ khoá: Củ gừng, đồ uống probiotic, vi khuẩn lactic, *L. plantarum* SM1.3.

Isolation and Selection of Lactic Acid Bacteria for Probiotic Beverage Production from Ginger

ABSTRACT

Lactic acid bacteria play an important role in the production of fermented foods. This study aimed to isolate and select lactic acid bacteria strains from fermented products for application in the production of ginger-based probiotic drinks. Forty six strains of bacteria were isolated. The isolates produced colonies with 1.0 to 1.5mm in diameter, mainly round, glossy, milky white, and floating pellicle in liquid culture. Six gram-positive, catalase-negative strains with rod or spherical shaped cells were pre-selected. Identification by MALDI-TOF revealed that they belong to 4 species of *Enterococcus faecium*, *Enterococcus casseliflavus*, *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus plantarum*. Further study was conducted for the strain *L. plantarum* SM1.3. It was tolerant to acid (pH 1.0-3.0) and 0.3% bile salts, and able to produce amylase, protease, and cellulase. This strain inhibited two tested bacteria, *E. coli* and *Salmonella* sp. Gene alignment results indicated that the strain SM1.2 belonged to *Limosilactobacillus fermentum* species and strain SM1.3 named *Lactiplantibacillus plantarum*. Ginger-based probiotic drink using *L. plantarum* SM1.3 has good sensory quality and bacterial density and can be stored up to 5 days at 4°C.

Keywords: Ginger, probiotic drink, lactic acid bacteria, *L. plantarum* SM1.3.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Gừng (*Zingiber officinale* Rose) được trồng và sử dụng phổ biến tại Việt Nam. Trong thực phẩm, củ gừng được sử dụng như một loại gia vị

do có mùi thơm, vị cay (Mahomoodally & cs., 2019). Trong y học, củ gừng có tác dụng kháng khuẩn, chống ký sinh trùng, chống oxy hóa, chống viêm, giảm đau, chống ung thư, bảo vệ gan, hỗ trợ tiêu hóa, kích thích miễn dịch (Bag,

2018). Thành phần dinh dưỡng chính của củ gừng bao gồm carbohydrat, lipid, nước, chất xơ, protein và khoáng chất. Ngoài ra, trong gừng còn chứa nhiều hợp chất phenol khác nhau bao gồm gingerols, paradols, shogaols và zingerones (Srinivasan, 2017). Ngoài sử dụng gừng tươi, khô, gừng còn được chế biến thành các sản phẩm tiện dụng khác như sauce, paste, các sản phẩm đồ uống lên men.

Quá trình lên men lactic được thực hiện bởi vi khuẩn lactic, có thể bởi vi khuẩn lên men tự nhiên hoặc chủng vi khuẩn lactic thuần. Phương pháp lên men bởi chủng thuần thường được áp dụng trong công nghệ thực phẩm nhờ khả năng lên men nhanh, kiểm soát tốt.

Sản phẩm lên men truyền thống của Việt Nam chủ yếu dựa trên hệ vi sinh vật tự nhiên. Vi khuẩn lactic như *L. plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *L. fermentum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus brevis* đã được tìm thấy trong nhiều loại sản phẩm lên men như nem chua, dưa muối, cà muối, tôm chua (Cao & cs., 2013; Nguyen, 2015; Rhee & cs., 2011).

Probiotic là những vi sinh vật còn sống khi đưa vào cơ thể một lượng đầy đủ sẽ có lợi cho sức khỏe của vật chủ. Chúng đóng một vai trò quan trọng trong việc bảo vệ vật chủ chống lại các vi sinh vật có hại đồng thời giúp tăng cường hệ thống miễn dịch. Sản phẩm chứa probiotic chủ yếu là thuộc nhóm vi khuẩn lactic.

Mục tiêu của nghiên cứu là phân lập, tuyển chọn các chủng vi khuẩn lactic có tiềm năng probiotic cao từ các nguồn thực phẩm lên men tự nhiên có chứa gừng và thử nghiệm sản xuất đồ uống lên men, góp phần đa dạng hóa sản phẩm, tận dụng được nguồn nguyên liệu dồi dào và nâng cao được giá trị cho củ gừng.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Gừng muối nguyên củ, nước ép gừng muối lên men và sung muối tự làm và thu mua tại các chợ tại Gia Lâm, Hà Nội được sử dụng làm nguồn phân lập vi sinh vật. Chủng vi khuẩn kiểm định được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm *Salmonella* sp., *Escherichia coli* cung cấp

bởi Bộ môn Vi sinh vật, Khoa Tài nguyên và Môi trường, Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Môi trường MRS được dùng để nuôi cấy và phân lập vi khuẩn lactic với thành phần (g/l) là glucose (20), pepton (10), cao thịt (10), cao nấm men (5), CaCO_3 (5), Tween (1), Diamoniumcitrat (2), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,58), $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,28), K_2HPO_4 (2), thạch (15), nước cất. Bên cạnh đó, môi trường PCA được dùng để xác định vi sinh vật hiếu khí tổng số có thành phần (g/l) gồm pepton từ casein (5), cao nấm men (2,5), glucose dạng khan (1,0), agar 15-20, nước cất.

Gừng trâu (*Zingiber officinale* Rosc.) được thu hoạch tại huyện Hà Quảng, Cao Bằng làm nguyên liệu cho sản phẩm đồ uống lên men lactic từ gừng. Gừng nguyên liệu sử dụng cho lên men là loại gừng non thu hoạch sau khi trồng từ 6-7 tháng, đã được gọt vỏ, làm sạch và cấp đông, cung cấp bởi Công Ty TNHH Phát triển Nông nghiệp và Tư vấn Môi trường (Dace).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập các chủng vi khuẩn lactic từ các mẫu thực phẩm chứa gừng

Dịch mẫu lên men (ml) được bổ sung trong nước cất vô trùng theo tỉ lệ 10:90 và pha loãng theo dãy tối hạn. Dung dịch đã pha loãng (0,1ml) được nhỏ vào đĩa thạch chứa môi trường MRS và trang đều bề mặt đến khi khô. Nhiệt độ nuôi cấy giữ 37°C trong 24-48 giờ. Vi khuẩn được cấy chuyển tiếp nhiều lần cho đến khi thu được ở mỗi đĩa petri là dòng khuẩn lạc đồng nhất (Bùi Xuân Đồng, 2018).

2.2.2. Xác định các đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa

Khuẩn lạc vi khuẩn được quan sát bằng mắt thường và tế bào vi khuẩn được xác định bằng cách quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính 100X. Đặc điểm sinh lý và sinh hóa bằng nhuộm Gram, thử nghiệm catalase.

2.2.3. Tuyển chọn chủng vi khuẩn có hoạt tính probiotic

Khả năng chịu axit dạ dày được thực hiện theo nghiên cứu của Nguyễn Thị Hồng Nhung & cs. (2019). Cụ thể, bổ sung dịch giống vi khuẩn

đã nuôi cấy qua 24 giờ vào môi trường MRS lỏng có pH khác nhau (1, 2, 3), nuôi vi khuẩn ở 30°C trong 3 giờ và đo các giá trị OD tại thời điểm 0 giờ và 3 giờ ở bước sóng 620nm.

Khả năng chịu muối mật được thực hiện bằng cách chuẩn bị các ống nghiệm chứa môi trường MRS bổ sung 0,3% muối mật, nhỏ 10% dịch giống vi khuẩn đã nuôi cấy dịch thể qua 24 giờ vào các ống nghiệm trên, sau đó mang nuôi ở 30°C. Mật độ tế bào trong mẫu được xác định bằng cách xác định mật độ quang ở bước sóng 620nm. Mức độ chịu muối mật được xác định bằng thời gian để tăng OD620nm sau khi nuôi 4 giờ so với ban đầu (Gilliland & Walker, 1990).

Khả năng sinh enzyme ngoại bào được thực hiện bằng phương pháp đục lỗ thạch trên môi trường có bổ sung cơ chất tinh bột, casein và CMC Nguyễn Lân Dũng & cs. (1976). Chúng vi khuẩn lactic được hoạt hóa trong môi trường MRS lỏng. Sau 48 giờ nuôi ở 37°C, dịch nuôi vi khuẩn lactic được ly tâm với tốc độ 6.000 vòng/phút trong 30 phút ở 4°C, thu dịch ly tâm. Dùng nút khoan có đường kính 5mm, đục lỗ thạch trên đĩa petri của môi trường có chứa 1% cơ chất tinh bột, casein hoặc CMC. Với mỗi chủng vi khuẩn lactic tiến hành nhỏ 0,1 ml dịch ly tâm đã thu vào lỗ thạch và đặt đĩa thạch trong tủ lạnh ở 4°C khoảng 2 giờ nhằm để dịch ly tâm khuếch tán đều vào trong thạch và tiếp tục được ủ ở 37°C trong 48 giờ để lượng dịch trong lỗ thạch thủy phân cơ chất. Hoạt tính của enzyme được đo bằng đường kính vòng phân giải cơ chất xung quanh lỗ thạch, tức D – d. Trong đó: D là đường kính vòng phân giải (mm), d là đường kính lỗ thạch (5mm).

Khả năng đối kháng với vi khuẩn gây bệnh kiểm định được thực hiện bằng phương pháp khuếch tán thạch của Herreros & cs. (2005). Chủng nghiên cứu được nuôi trong môi trường

MRS lỏng ở 30°C, từ 18-20 giờ, dịch nổi thu được nhờ ly tâm và chỉnh pH về trung tính (6,7-6,8). Chúng kiểm định được nuôi qua đêm trong môi trường LB (Luria - Bertani) lỏng ở 30°C Nhỏ 30µl dịch vi khuẩn gây bệnh mật độ 10^8 CFU/ml (tương ứng với McFarland 0,5) (CLSI, 2012) lên đĩa thạch rồi cấy chang và khoan lỗ thạch. Nhỏ dịch ly tâm được chỉnh pH vào các lỗ thạch và giữ ở nhiệt độ 4°C/4 giờ, sau đó ủ ở 30°C/24 giờ. Căn cứ vào vòng ức chế vi sinh vật kiểm định để xác định chủng có khả năng kháng vi sinh vật (Schillinger & Lucke, 1989). Hoạt tính kháng khuẩn của các vi sinh vật tuyển chọn được tính bằng đường kính vòng kháng khuẩn ΔD : $\Delta D = D - d$ (mm), trong đó: D là đường kính vòng kháng khuẩn (mm); d là đường kính lỗ thạch (mm).

2.2.4. Định danh chủng vi khuẩn lactic bằng phương pháp khối phổ MALDI-TOF và xác định trình tự gen 16S rRNA

a. Định danh chủng vi khuẩn lactic bằng phương pháp khối phổ MALDI-TOF (Matrix assisted laser desorption ionization - time of flight)

Phương pháp định danh vi khuẩn sử dụng hệ thống MALDI Biotyper - Bruker. Khuẩn lạc được phết lên đĩa target, tạo lớp phết mỏng và đồng nhất, rồi làm khô ở nhiệt độ phòng. Dung dịch HCCA matrix (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid) (1ml) được đặt lên trên mẫu, để khô ở nhiệt độ phòng rồi sử dụng hệ thống MALDI Biotyper - Bruker để đo.

Phân tích phân tử ion hóa nhờ matrix và tia lazer, sau đó đo thời gian bay dựa trên khối lượng. Định danh vi sinh vật bằng dấu ấn phân tử, so sánh sự tương đồng của phổ protein từ mẫu vi sinh vật mục tiêu với cơ sở dữ liệu các chủng vi sinh vật khác nhau (Doan & cs., 2012).

Bảng 1. Độ tin cậy của kết quả định danh theo phương pháp khối phổ MALDI-TOF

Khoảng	Diễn giải	Ký hiệu	Màu sắc
2.000-3.000	Xác định ở độ tin cậy cao	(+++)	Xanh 
1.700-1.999	Xác định ở mức độ tin cậy thấp	(+)	Vàng 
0.000-1.699	Không xác định được vi sinh vật	(-)	Đỏ 

Báo cáo bao gồm danh sách các loài phù hợp nhất được phân loại theo độ tương đồng của dấu vân protein, kèm theo giá trị cho biết mức độ xác định loài hoặc chi vi sinh vật. Mức độ tin cậy của kết quả được trình bày ở bảng 1.

b. Định danh phương pháp xác định trình tự gen 16S rRNA

Các gen 16S rRNA của các chủng vi khuẩn lactic được khuếch đại bằng cách sử dụng cặp mồi phổ quát 27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCT CAG-3' và 1492R 5'-GGCTACCTTGTTACGAC TT-3' (Barman & cs., 2018). Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ dụng cụ làm sạch PCR GenElute (Sigma, Hoa Kỳ) và được giải trình tự theo cả hướng thuận và nghịch. Các trình tự sau đó được xử lý và so sánh sử dụng công cụ tìm kiếm BLASTn từ cơ sở dữ liệu GenBank theo mô tả của Chen & cs. (2008).

2.2.4. Thử nghiệm sản xuất đồ uống probiotic từ gừng

Chủng vi khuẩn lactic đã tuyển chọn được nhân giống qua hai cấp. Ở giai đoạn nhân giống cấp 1, vi khuẩn lactic được nhân giống trong 10ml môi trường MRS trong thời gian 24 giờ ở 37°C. Ở giai đoạn nhân giống cấp 2, đổ 10ml dịch nhân giống cấp 1 vào 100ml môi trường MRS, nuôi ở 37°C trong 24 giờ. Trước khi bổ sung vi khuẩn vào sản phẩm, dịch giống được ly tâm lạnh ở 4°C với 6.000 vòng trong 10 phút. Phần dịch bên trên được gạn để thu phân cận vi khuẩn phía dưới.

Gừng nguyên liệu được ép để thu dịch. Thông số kỹ thuật chuẩn bị dịch trước khi lên men là: tỉ lệ dịch ép gừng - nước là 1/20, tỉ lệ muối là 0,7%, đường là 2,8%. Hỗn hợp dịch được thanh trùng ở 80°C/5 phút và làm nguội nhanh xuống 30°C. Vi khuẩn đã nuôi cấy được tiếp

giống là 2% (đạt được mật độ vi khuẩn đưa lên men là 10⁵ CFU/ml, dậy nấp và tiến hành lên men ở 30°C cho tới khi pH đạt 4,2 ± 0,2, các tính chất cảm quan đạt từ khá trở lên.

Sản phẩm được xác định một số chỉ tiêu vi sinh vật và đánh giá cảm quan theo TCVN 3215-79. Phương pháp đánh giá cảm quan cho điểm chất lượng tổng hợp về các tiêu chí màu sắc, mùi, vị, trạng thái. Các chỉ tiêu được đánh giá theo thang điểm từ 0-5 để đánh giá chất lượng sản phẩm (Hà Duyên Tư, 2010).

2.3. Xử lý số liệu

Các số liệu thu thập được xử lý thống kê bằng phần mềm Minitab 16 và Excel 2013. Kết quả được phân tích bằng phương pháp ANOVA một chiều. Sự khác biệt của giá trị trung bình được đánh giá nhờ phép so sánh Tukey với mức tin cậy 95%.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập chủng vi khuẩn lactic

Tổng số 46 khuẩn lạc đã được phân lập trên môi trường MRS từ các mẫu gừng muối và mẫu sung muối. Các khuẩn lạc có dạng hình tròn, bóng, lồi, màu sắc khuẩn lạc trắng đục, hoặc trắng sữa. Kích thước khuẩn lạc tương đối nhỏ thường dao động 1,0-1,5mm.

Chủng vi khuẩn mang đặc điểm sinh hóa (Gram dương và catalase âm) và đặc điểm hình thái tế bào (hình que hoặc hình cầu) được lựa chọn do có đặc điểm của vi khuẩn lactic theo mô tả của Salminen & cs. (2004). Đặc điểm hình thái tế bào và đặc điểm sinh hóa của 6 chủng lựa chọn được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. Đặc điểm hình thái và sinh lý, sinh hóa của chủng vi khuẩn phân lập được

Kí hiệu chủng	Hình thái tế bào	Gram	Catalase
GM2.10	Cầu khuẩn, đứng riêng lẻ/ chuỗi ngắn	+	-
GM2.11	Cầu khuẩn, đứng riêng lẻ/ chuỗi ngắn	+	-
GM2.17	Cầu khuẩn, đứng riêng lẻ/ chuỗi ngắn	+	-
SM1.2	Trực khuẩn, đứng riêng lẻ/ chuỗi ngắn	+	-
SM1.3	Trực khuẩn, đứng riêng lẻ/ chuỗi ngắn	+	-
SM1.5	Trực khuẩn, đứng riêng lẻ/ chuỗi ngắn	+	-

Bảng 3. Kết quả định danh bằng hệ thống khối phổ MALDI - TOF

Kí hiệu chủng	Loài được phát hiện	Điểm	Độ tin cậy
GM2.10	<i>Enterococcus faecium</i>	2,27	Cao
GM2.11	<i>Enterococcus faecium</i>	2,28	Cao
GM2.17	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	2,21	Cao
SM1.2	<i>Lactobacillus fermentum</i>	1,75	Thấp
SM1.3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2,05	Cao
SM1.5	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2,04	Cao

Chủng vi khuẩn GM2.10, GM2.11 và GM2.17 có hình thái tế bào hình cầu, đứng riêng rẽ hoặc thành chuỗi ngắn. Chủng SM1.2, SM1.3 và SM1.5 tế bào dạng hình que (trực khuẩn), đứng riêng lẻ hoặc xếp thành chuỗi do đang trong quá trình phân cắt tế bào. Kết quả định danh bằng khối phổ MALDI-TOF cho 6 chủng vi khuẩn lựa chọn được trình bày trong bảng 3.

Kết quả khi so sánh khối phổ cho thấy hai vi khuẩn GM2.11 (GM2.10) và GM2.17 được xác định lần lượt là *Enterococcus faecium* và *Enterococcus casseliflavus* với độ tin cậy cao (2,28 và 2,71) thuộc chi *Enterococcus*. Thành viên của chi *Enterococcus* đứng thứ ba sau *Lactobacilli* và *Streptococcus* trong danh sách các nhóm lớn nhất của LAB. Chúng có khả năng chịu độ mặn cao, thậm chí 6,5% NaCl, muối mật lên đến 40%, với các điều kiện axit khác nhau và có thể tồn tại trong 30 phút ở 60°C (Ogier, 2008). Một số *Enterococcus* cho thấy các đặc tính tiềm năng của probiotic và khả năng tăng cường sức khỏe (Tachibana & cs., 2020). Do đó các chủng vi khuẩn *Enterococcus* được sử dụng như chế phẩm sinh học và ứng dụng cho các ngành bao gồm dược phẩm, thuốc chữa bệnh cho người và thú y, ngành công nghiệp thực phẩm như sản phẩm sữa hoặc thực phẩm lên men, chất bổ sung thức ăn chăn nuôi.

Chủng SM1.2 và SM1.3 (SM1.5) lần lượt được xác định là *Lactobacillus fermentum* và *Lactobacillus plantarum*. Các vi khuẩn này thuộc chi *Lactobacillus*. Chúng được ứng dụng trong lên men sữa, thịt và nhiều loại rau củ khác (Behera & cs., 2018). Với tiềm năng probiotic cao, cả 2 loại vi khuẩn này không chỉ được ứng dụng trong ngành công nghiệp thực

phẩm mà còn được ứng dụng trong việc ngăn ngừa và điều trị vấn đề sức khỏe khác nhau (Mikelsaar & cs., 2009). Với 6 chủng trên, dựa trên mức độ tương đồng của chủng GM2.10, GM2.11 và chủng SM1.3, SM1.5, chủng có độ tin cậy cao hơn sẽ được lựa chọn. 4 chủng sẽ được tiếp tục nghiên cứu là GM2.11, GM2.17, SM1.2, SM1.3.

3.2. Tuyển chọn các chủng vi khuẩn có hoạt tính probiotic

Bốn chủng vi khuẩn được tiến hành khảo sát các đặc tính probiotic bao gồm khả năng chịu axit dạ dày, khả năng chịu muối mật, khả năng sinh enzyme ngoại bào và khả năng kháng khuẩn. Kết quả được thể hiện trong các hình 1, 2, 3 và bảng 3, 4.

Hình 1 cho thấy tất cả các chủng vi khuẩn đều có khả năng chịu được nồng độ pH thấp. Đặc biệt 2 chủng *E. casseliflavus* GM2.17 và *L. plantarum* SM1.3 có khả năng chịu được pH rất thấp (pH 1). Kết quả này tương đồng với các kết quả nghiên cứu của Chevalier & cs. (2022) và Huỳnh Phương Trang (2018) cũng cho thấy khả năng chịu axit dạ dày của *E. casseliflavus* và *L. plantarum*.

Đối với khả năng chịu muối mật, các chủng vi khuẩn này đều có khả năng chịu muối mật ở những mức độ khác nhau. Trong đó có 3 chủng sau 4 giờ có ΔOD đo ở bước sóng 620nm trên 0,3 đó là các chủng GM2.17, SM1.2 và SM1.3. Kết quả nghiên cứu của Mohamed & cs. (2022) hoặc của Huỳnh Phương Trang (2018) cũng cho thấy khả năng chịu axit dạ dày của *E. casseliflavus* GM2.17, *L. fermentum* SM1.2 và *L. plantarum* SM1.5. Chủng GM2.11 ΔOD sau 4 giờ chỉ đạt

0,105 thấp hơn so với các chủng còn lại nhưng vẫn có khả năng phát triển trong môi trường có nồng độ muối mật cao.

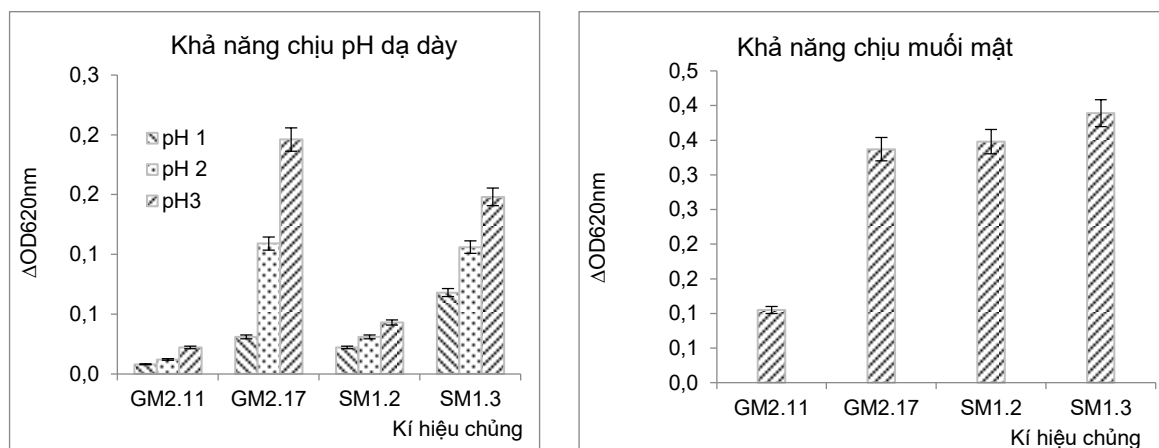
Kết quả trong bảng 4 và hình 2 cho thấy khả năng sinh enzyme của các chủng vi khuẩn có sự khác nhau. Chủng vi khuẩn *L. fermentum* SM1.2, SM1.3 và *E. casseliflavus* GM3.17 có khả năng phân giải cả ba enzyme mạnh. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Hồng Nhung & cs. (2019) khi nghiên cứu phân lập vi khuẩn lactic từ các mẫu thực phẩm lên men cũng thu được kết quả đường kính vòng phân giải cơ chất của cellulase và protease lớn hơn amylase. Trong khi đó, vi khuẩn *E. faecium* chỉ phân giải được cơ chất sinh ra enzyme cellulase và protease.

Đối với khả năng kháng hai chủng vi sinh vật kiểm định (Bảng 5, Hình 3), nhận thấy rằng cả 2 chủng thuộc chi *Enterococcus* không có khả

năng kháng lại các chủng vi khuẩn gây bệnh, ngược lại là khả năng kháng vi khuẩn kiểm định rất mạnh đến từ 2 chủng của chi *Lactobacillus*. Nghiên cứu của Nguyễn Thị Hồng Nhung & cs. (2019) với các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* có khả năng kháng các vi khuẩn gây bệnh rất tốt, các vòng kháng khuẩn dao động từ 16-22mm.

Hai chủng có hoạt tính probiotic cao SM1.2 và SM1.3 được tiếp tục định danh bằng phương pháp xác định trình tự gen 16S rRNA để khẳng định loài, kiểm tra mức độ an toàn cho ứng dụng trong đồ uống lên men từ gừng, đồng thời so sánh sự tương đồng giữa hai phương pháp khối phổ và xác định trình tự gen.

Phản ứng PCR đã được thực hiện sử dụng cặp mồi 27F và 1492R để nhân toàn bộ vùng gen mã hoá tiểu phần 16S rRNA. Kết quả PCR được thể hiện ở hình 4.



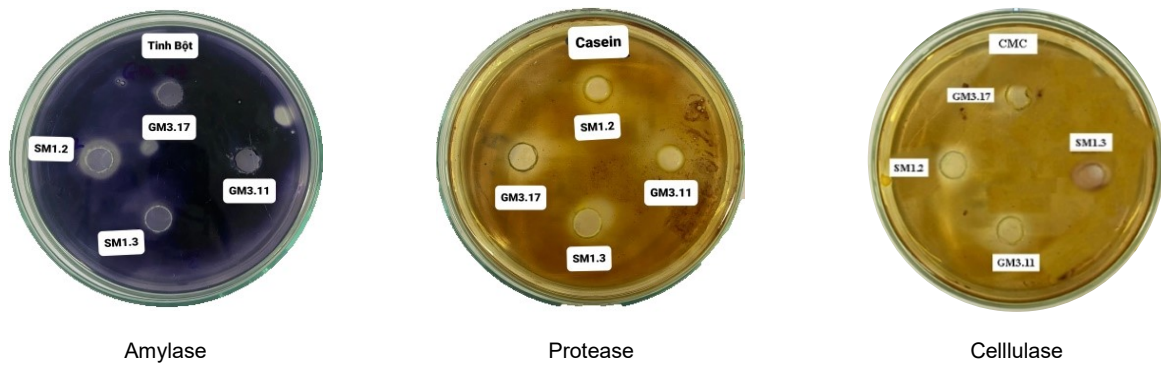
Ghi chú: GM2.11 (*Enterococcus faecium* GM2.11), GM3.17 (*Enterococcus casseliflavus* GM3.17), SM1.2 (*Lactobacillus fermentum* SM1.2), SM1.3 (*Lactobacillus plantarum* SM1.3).

Hình 1. Khả năng chịu pH dạ dày và muối mật của bốn chủng vi khuẩn

Bảng 4. Khả năng sinh enzyme ngoại bào của bốn chủng vi khuẩn

Kí hiệu chủng	Đường kính vòng phân giải cơ chất D – d (mm)		
	Amylase	Protease	Cellulase
GM2.11	0	3,3 ^d ± 0,6	4,4 ^b ± 0,4
GM2.17	5,5 ^b ± 0,1	5,5 ^a ± 0,5	2,5 ^d ± 0,5
SM1.2	7,2 ^a ± 0,3	5,0 ^c ± 0,0	5,0 ^a ± 0,5
SM1.3	5,2 ^c ± 0,3	5,3 ^b ± 0,6	3,5 ^c ± 0,5

Ghi chú: Trong cùng một cột các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác nhau là có ý nghĩa ở mức $\alpha = 0,05$.



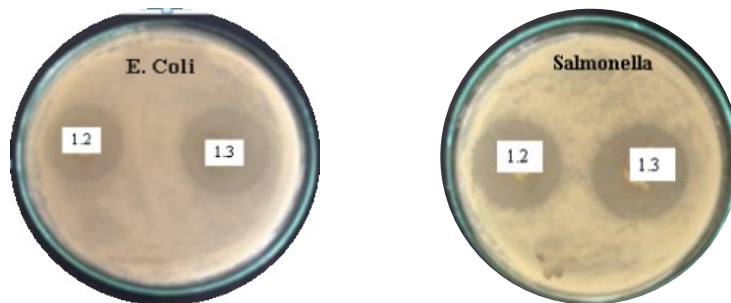
Ghi chú: GM2.11 (*Enterococcus faecium* GM2.11), GM3.17 (*Enterococcus casseliflavus* GM3.17), SM1.2 (*Lactobacillus fermentum* SM1.2), SM1.3 (*Lactobacillus plantarum* SM1.3).

Hình 2. Hình ảnh vòng phân giải enzyme của bốn chủng vi khuẩn

Bảng 5. Khả năng kháng các chủng vi khuẩn kiểm định

Kí hiệu chủng	Đường kính vòng kháng khuẩn ΔD (mm)	
	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> sp.
GM2.11	0 ^c	0 ^c
GM2.17	0 ^c	0 ^c
SM1.2	12,50 ^b $\pm$ 0,50	14,57 ^b $\pm$ 0,29
SM1.3	16,00 ^a $\pm$ 0,00	17,33 ^a $\pm$ 0,29

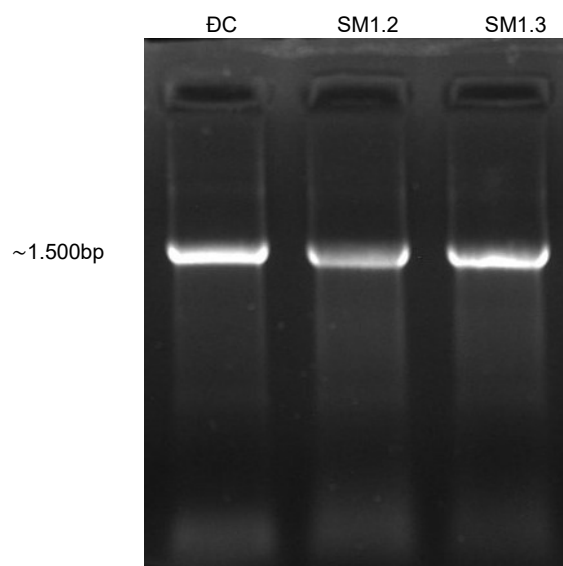
Ghi chú: Trong cùng một cột các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác nhau là có ý nghĩa ở mức $\alpha = 0,05$.



Hình 3. Hình ảnh vòng kháng khuẩn của hai chủng vi khuẩn SM1.2 và SM1.3

Sau khi giải mã gen, trình tự thu được từ vùng gen mã hoá 16S rRNA có kích thước 1500bp có tín hiệu rõ, sau khi so sánh trên ngân hàng gen sử dụng BLAST, kết quả cho thấy chủng SM1.2 thuộc loài *Limosilactobacillus fermentum* (độ tương đồng 99,78% với chủng *Limosilactobacillus fermentum* SCB0035) và chủng SM1.3 thuộc loài *Lactiplantibacillus plantarum* (độ tương đồng 100% với các chủng *Lactiplantibacillus plantarum* KUMS-C39,

LpYC41, HBUAS51526, HBUAS51458, HBUAS51444). *Limosilactobacillus fermentum* và *Lactiplantibacillus plantarum* là các tên latin cập nhật của *Lactobacillus fermentum* và *Lactobacillus plantarum*. Như vậy, kết quả của hai phương pháp định danh bằng khối phổ MALDI-TOF và giải trình tự gen có độ chính xác cao. Kết quả này cũng phù hợp với kết luận của Doan & cs. (2012), khi sử dụng MALDI-TOF MS để phân loại và xác định nhanh vi khuẩn lactic.



Ghi chú: Giếng số 1: Đối chứng dương 1500bp, Giếng số 2: Sản phẩm PCR của chủng SM1.2, Giếng số 3: Sản phẩm PCR của chủng SM1.3.

Hình 4. Phổ điện di sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen 16S rRNA của chủng SM1.2 và SM1.3

Rất nhiều nghiên cứu đã công bố nhiều chủng *L. plantarum* có đặc tính probiotic cao. Hơn nữa, *L. plantarum* được công nhận là vi khuẩn an toàn cho sức khỏe con người, được ứng dụng nhiều trong thực phẩm (Da Silva Sabo & cs., 2014). Như vậy, chủng vi khuẩn *L. plantarum* SM1.3 sẽ được chọn là vi khuẩn chính cho quá trình lên men đồ uống lactic từ gừng.

3.3. Thử nghiệm sản xuất đồ uống probiotic từ gừng sử dụng chủng vi khuẩn *L. plantarum*

Dịch nước gừng đã bổ sung nước đường, muối như đã mô tả trong phần 2.2.5, tiếp giống 2% với chủng *L. plantarum* SM1.3. Sau khi lên men ở 30°C trong 48 giờ, sản phẩm được bảo quản nhiệt độ 4°C và được phân tích chỉ tiêu về pH, acid tổng số, chất lượng vi sinh và đánh giá chất lượng cảm quan trong các khoảng thời gian từ 3 ngày trở đi, cách 2 ngày phân tích một lần. Kết quả được trình bày trong bảng 6.

Từ kết quả trên bảng 6, giá trị pH và axit tổng số của sản phẩm có sự thay đổi từ ngày sau khi kết thúc lên men đến ngày thứ 3 bảo quản. Mặc dù điều kiện nhiệt độ thấp nhưng hoạt động lên men vẫn diễn ra. Từ ngày 3 đến ngày 7

bảo quản pH của sản phẩm giảm nhưng tốc độ chậm và đều và nồng độ acid tăng nhẹ. Xét về chất lượng cảm quan nhận thấy rằng cả hai sản phẩm vẫn giữ được chất lượng cảm quan tốt đến ngày bảo quản thứ 5, chất lượng sản phẩm đạt loại khá. Ngày thứ 7 bảo quản, sản phẩm bắt đầu có những biến đổi về màu sắc (sẫm màu hơn), phân lắng cặn nhiều và sậm màu hơn, mùi chua hơn, không đảm bảo yêu cầu chất lượng. Như vậy, sản phẩm đến ngày thứ 5 vẫn đạt yêu cầu về pH và giá trị cảm quan.

Mật độ chủng vi khuẩn *L. plantarum* SM1.3 đạt yêu cầu đến trước ngày thứ 7, bắt đầu từ ngày bảo quản thứ 7, mật độ vi khuẩn bắt đầu giảm và không đạt theo giới hạn tiêu chuẩn. Điều này có thể giải thích mặc dù vi khuẩn lactic có thể lên men được trên các cơ chất có chứa gừng, tuy nhiên lượng hoạt chất sinh học trong gừng và axit sinh ra cũng một phần ức chế sự hoạt động của chúng so với các cơ chất lên men khác. Sản phẩm đồ uống lên men lactic từ gừng nên sử dụng trước 7 ngày để có thể đảm bảo được chất lượng tốt nhất của sản phẩm. Việc xác định các điều kiện tối ưu để chủng SM1.3 phát triển tốt hơn, kéo dài được thời gian bảo quản cần được thực hiện sâu thêm ở những nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 6. Chất lượng của đồ uống probiotic từ gừng trong quá trình bảo quản

Thời gian bảo quản (ngày)	pH	Axit	Chất lượng cảm quan		Chỉ tiêu vi sinh vật		
			Điểm cảm quan	Xếp loại	Mật độ <i>L. plantarum</i> SM1.3 (CFU/g)	Giới hạn tiêu chuẩn	Đánh giá
0	4,36	0,54	18,84	Tốt	$1,01 \times 10^6$	$\geq 10^6$	Đạt
3	3,52	0,72	17,60	Khá	$1,12 \times 10^6$		Đạt
5	3,37	0,86	15,76	Khá	$1,62 \times 10^6$		Đạt
7	3,28	0,99	7,72	Kém	$5,0 \times 10^4$		Không đạt

4. KẾT LUẬN

Từ 46 chủng phân lập từ các mẫu gừng và sung muối, chủng *L. plantarum* SM1.3 có hoạt tính probiotic cao đã được tuyển chọn để sử dụng cho quá trình lên men đồ uống lactic từ gừng. Đồ uống probiotic từ gừng thành phẩm có chất lượng cảm quan đạt loại tốt và đạt yêu cầu về mật độ vi khuẩn *L. plantarum* SM1.3 trong 5 ngày bảo quản. Kết quả của nghiên cứu tạo tiền đề cho việc phát triển các loại đồ uống lên men nói chung và đồ uống probiotic từ gừng nói riêng để đáp ứng nhu cầu của người tiêu dùng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bag B.B. (2018). Ginger processing in India (*Zingiber officinale*): A review. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 7(04): 1639-1651
- Barman S. Ghosh R. & Mandal N.C. (2018). Production optimization of broad spectrum bacteriocin of three strains of *Lactococcus lactis* isolated from homemade buttermilk. Annals of Agrarian Science. 16(3): 286-296. <https://doi.org/10.1016/j.aasci.2018.05.004>.
- Behera S.S., Ray R.C. & Zdoiec N. (2018). *Lactobacillus plantarum* with functional properties: an approach to increase safety and shelf-life of fermented foods. BioMed Research International.
- Bùi Xuân Đồng (2018). Công nghệ enzyme. Trường Đại học Bách Khoa Đà Nẵng.
- Cao H.L., Son C.K., Ha H.P., Florence H., Binh L.T., Mai L.T., Tram N.T.H., Khanh T.T.M. Viet P.T., Dominique V. & Yves W. (2013). Tropical traditional fermented food, a field full of promise. Examples from the tropical bioresources and biotechnology programme and other related French-Vietnamese programmes on fermented food. International journal of food science & technology. 48(6): 1115-1126.
- Chen W., Chen H., Xia Y., Zhao J., Tian F. & Zhang H. (2008). Production, purification, and characterization of potential thermostable galactosidase for milk lactose hydrolysis from *Bacillus stearothermophilus*. Journal of Dairy Science. 91(5): 1751-58.
- CLSI (2012). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard, 7th ed., CLSI document M02-A11. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA.
- Doan N.T.L., Van Hoorde K., Cnockaert M., De Brandt E., Aerts M., Le Thanh B. & Vandamme P. (2012). Validation of MALDI-TOF MS for rapid classification and identification of lactic acid bacteria, with a focus on isolates from traditional fermented foods in Northern Vietnam. Letters in applied microbiology. 55(4): 265-273.
- Da Silva Sabo S., Vitolo M., González J.M.D. & de Souza Oliveira R.P. (2014). Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. Food Research International. 64: 527-536.
- Gilliland S.E. & Walker D.K. (1990). Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypercholesterolemic effect in humans. Journal of Dairy Science. 73(4): 905-909
- Herreros M.A., Sandoval H., Gonzalez L., Castro J.M., Fresno J.M. & Tornadito M.E. (2005). Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). Food Microbiol. 22 (5): 455-459.
- Huỳnh Phan Phương Trang (2018). Thử nghiệm nước chanh dây độ cồn thấp bổ sung vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* LY-78. Tạp chí khoa học Công nghệ và Thực phẩm. 16(1): 56-66.
- Hà Duyên Tư (2010). Kỹ thuật phân tích cảm quan thực phẩm. Nhà xuất bản Khoa học kỹ thuật.

- Mahomoodally M.F., Aumeeruddy M.Z., Rengasamy K.R.R., Roshan S., Hammad S., Pandohee J., Hu X. & Zengin G. (2019). Ginger and its active compounds in cancer therapy: From folk uses to nano therapeutic applications. *Seminars in Cancer Biology*. 69: 140-149.
- Mohamed Z., Sylvie C., Marc G.J.F. & Nathalie C. (2022). Special Issue "Enterococci for Probiotic Use: Safety and Risk": Editorial. *Microorganisms*. 10: 604.
- Mikelsaar M. & Zilmer M. (2009). *Lactobacillus fermentum* ME-3 - an antimicrobial and antioxidative probiotic. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 21(1): 1-27.
- 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>.
- Nguyễn Lâm Dũng, Đoàn Xuân Mượn, Nguyễn Phùng Tiến, Đặng Đức Trạch & Phạm Văn Ty (1976). Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học (Tập 2). Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội.
- Nguyễn Thị Hồng Nhung, Lê Thị Thương, Nguyễn Thị Thu Hằng & Nguyễn Thị Huyền (2019). Tuyển chọn các chủng vi khuẩn lactic có tiềm năng ứng dụng tạo chế phẩm sinh học probiotic bổ sung vào thức ăn chăn nuôi. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*. 2: 18-27.
- Ogier J.C. & Serror P. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The Enterococcus genus. *International Journal of Food Microbiol.* 126: 291-301.
- Rhee S.J., Lee J.E. & Lee C.H. (2011, December). Importance of lactic acid bacteria in Asian fermented foods. In *Microbial Cell Factories*. 10(1): 1-13. BioMed Central.
- Salminen S., Wright A.V. & Ouwehand A. (2004). Lactic acid bacteria Microbiological and Functional Aspect. Third edition, Revised and Expanded by Marcel Dekker, In.
- Schillinger U. & Lücke F.K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sakei* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*. 55(8): 1901-1906.
- Srinivasan K. (2017). Ginger rhizomes (*Zingiber officinale*): A spice with multiple health beneficial potentials. *PharmaNutrition*. 5: 18-28.
- Tachibana L., Telli G.S., de Carla Dias D., Gonçalves G.S., Ishikawa C.M., Cavalcante R.B., Natori M. M., BenHamed S. & Ranzani-Paiva M.J.T. (2020). Effect of feeding strategy of probiotic *Enterococcus faecium* on growth performance, hematologic, biochemical parameters and non-specific immune response of Nile tilapia. *Aquaculture Reports*. 16: 100277.
- Zielinska D. & Kolozyn-Krajewska D. (2018). Food-origin lactic acid bacteria may exhibit probiotic properties. *Bio Med rRes Int*. pp. 1-15.