

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VI KHUẨN LACTIC VÀ ỨNG DỤNG TRONG LÊN MEN NEM CHUA CHAY TỪ CÙI BƯỞI NĂM ROI

Nguyễn Ngọc Thanh, Trương Thị Ngọc Huyền, Nguyễn Thị Mộng Cẩm, Lâm Cảnh Tân,
Trần Thiên Nhã Ái, Lưu Minh Châu, Bùi Hoàng Đăng Long, Huỳnh Xuân Phong*

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

*Tác giả liên hệ: hxphong@ctu.edu.vn

Ngày nhận bài: 10.10.2022

Ngày chấp nhận đăng: 04.08.2023

TÓM TẮT

Nhằm tận dụng nguồn vỏ bưởi sau quá trình chế biến, nghiên cứu này được tiến hành nhằm phân lập, tuyển chọn và ứng dụng các chủng vi khuẩn lactic trong sản xuất nem chua vỏ bưởi. Các chủng vi khuẩn lactic được phân lập từ 7 mẫu nem thương mại được đánh giá khả năng kháng khuẩn và sinh axit lactic cao trong môi trường MRS lỏng có bổ sung D-glucose (20 g/l) cũng như thử nghiệm lên men nem chua chay từ cùi bưởi Năm Roi. Kết quả đã phân lập được 13 chủng vi khuẩn lactic từ 7 mẫu nem chua. Tất cả các chủng phân lập được đều cho thấy hoạt tính kháng khuẩn với vi khuẩn chỉ thị *Bacillus subtilis* với chiều rộng vùng kháng khuẩn dao động trong khoảng 2,0-14,33mm. Đánh giá khả năng lên men trên môi trường MRS lỏng cho thấy các chủng TP, XP2, OM2 và CR2 sinh hàm lượng axit lactic cao nhất nằm trong khoảng 19,6-20,33 g/l. Trong đó, chủng TP và chủng DT2 được tuyển chọn và ứng dụng trong lên men nem chua cùi bưởi do có khả năng sinh hàm lượng axit cao với hương thơm đặc trưng. Kết quả định danh đã xác định chủng DT2 và TP lần lượt là *Lactobacillus plantarum* và *Lactobacillus fermentum*.

Từ khóa: Kháng khuẩn, nem chua, nem vỏ bưởi, vi khuẩn lactic.

Isolation, Selection of Lactic Bacteria and Application in Fermentation of Pomelo Peel

ABSTRACT

In order to take advantage of the abundant source of pomelo peel, this study was conducted to isolate, select and apply lactic acid bacteria strains in the production of fermented product from pomelo peel. Lactic acid bacteria strains were isolated from 7 samples of commercial Nem chua (Vietnamese fermented pork roll), evaluated for their antibacterial ability and high lactic acid production in MRS broth medium supplemented with D-glucose (20 g/l) as well as screened for lactic acid fermentation of Nam Roi pomelo peel. The results showed that 13 lactic acid bacteria strains were isolated from 7 kinds of Nem chua. All isolates had antibacterial activity against *B. subtilis* and created an antibacterial range of 2.0 to 14.33 mm. Evaluation of fermentation ability on MRS broth medium showed that the strains TP, XP2, OM2, and CR2 produced the highest lactic acid content in the range of 19.6 to 20.33 g/l. The strains TP and DT2 were selected for production of fermented pomelo peel with high acid production and good taste. The strains DT2 and TP were identified as *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum*, respectively.

Keywords: Antibacterial, fermented pomelo peel, lactic acid bacteria, nem chua.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bưởi là một trong những loại trái cây được tiêu thụ nhiều trên thế giới với các đặc tính dinh dưỡng tốt cho sức khỏe. Bưởi chứa nhiều vitamin, khoáng chất, chất xơ và các hợp chất có hoạt tính sinh học (Meléndez-Martínez & cs., 2008; Roussos, 2011). Theo quy hoạch của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn trong phát

triển cây có múi, đến năm 2020, diện tích trồng bưởi quy hoạch chiếm vị trí thứ nhất lên đến 27.900ha. Trong đó, Vĩnh Long có diện tích trồng bưởi lên đến 8.500ha với sản lượng gần 82.000 tấn/năm. Tại Việt Nam, bưởi Năm Roi là giống bưởi được ưa chuộng bởi nó có vị ngọt thanh, hơi chua nhẹ, không đắng, không the, có mùi thơm đặc trưng. Bưởi Năm Roi thường được sử dụng trực tiếp ở dạng quả tươi, nước ép hay

được dùng để lên men rượu. Khi lượng bưởi được tiêu thụ nhiều sẽ tạo ra lượng chất thải khá lớn tương ứng (như vỏ, cùi, hạt) và gây ra các vấn đề ô nhiễm cho môi trường. Theo báo cáo của Zema & cs. (2018), hằng năm có khoảng 10 triệu tấn chất thải được tạo ra từ quá trình chế biến trái cây có múi trên toàn cầu.

Do cấu tạo đặc biệt, phần vỏ của các loại cây có múi thường rất dày, trong đó, vỏ bưởi chiếm tới 30% trọng lượng quả. Ở Việt Nam, phần vỏ xanh được tận dụng để chưng cất thu tinh dầu còn phần trắng hay cùi bưởi được dùng để nấu chè bưởi hoặc làm nem bưởi tại các cơ sở truyền thống. Các nghiên cứu trước đây đã tiến hành phân tích thành phần cùi bưởi *Citrus grandis* và cho thấy hàm lượng carbohydrate chiếm 72,62%, protein là 6,27%, chất béo là 1,56% và hàm lượng tro là 3,41% (Zain & cs., 2014). Hơn nữa, trong cùi bưởi còn chứa nhiều hợp chất phytochemical, bao gồm chất bay hơi có mùi thơm, pectin, flavonoid, axit phenolic, carotenoid, coumarin (Tocmo & cs., 2020). Điều này cho thấy tận dụng cùi bưởi như là nguồn nguyên liệu tiềm năng để phát triển các loại thực phẩm chức năng và thực phẩm giàu dinh dưỡng cũng như hướng tới sự bền vững của nông nghiệp.

Nem chua là một sản phẩm truyền thống phổ biến ở Việt Nam. Nem chua đặc trưng bởi việc làm chín thịt không qua quá trình gia nhiệt mà nhờ sự lên men của các vi khuẩn lactic tự nhiên. Nem chua có hương vị thơm ngon và đặc trưng. Không chỉ vậy, nó cũng hỗ trợ hoạt động tiêu hoá cho người tiêu dùng do có sẵn một lượng lợi khuẩn (Nguyen & cs., 2010). Thông thường, khi nhắc đến nem chua thì thường được biết đến là nem chua từ thịt. Khái niệm về nem chua “chay” ít phổ biến hơn và chỉ lưu hành ở một số tỉnh như Tây Ninh và Bến Tre. Sản phẩm nem chua cùi bưởi trên thị trường hiện nay thường được sản xuất ở quy mô nhỏ với nguyên liệu chính bao gồm cùi bưởi, đu đủ bào sợi, trộn cùng nước khế, tỏi, gia vị,... được lên men tự nhiên do hệ vi sinh vật có sẵn trong nguyên liệu và môi trường sản xuất, đặc biệt là vi khuẩn lactic. Hiện nay, việc lựa chọn các vi sinh vật khởi động ngày càng được chú trọng để đảm bảo an toàn và chất lượng của thực phẩm

lên men. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện để tìm kiếm các chủng vi khuẩn có khả năng kháng khuẩn và lên men tốt trên cùi bưởi. Trên cơ sở đó, các chủng vi khuẩn này được ứng dụng vào quá trình sản xuất nem từ cùi bưởi như giống khởi động, giúp tạo ra sản phẩm có chất lượng tốt và ổn định. Hơn nữa, nghiên cứu còn góp phần nâng cao giá trị nông sản và tăng thêm nguồn thu nhập cho hộ dân trồng bưởi.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu và hóa chất

Nguồn nguyên liệu dùng để phân lập là các mẫu nem chua khác nhau được mua tại thành phố Cần Thơ (kí hiệu: CR, XP), tỉnh Đồng Tháp (ĐT, LV), Vĩnh Long (VL) và Tiền Giang (OM, TP). Ba chủng vi khuẩn lactic gồm HCM (Trương Thị Thúy Nguyên & cs., 2020), L11 và L30 (Huynh & cs., 2017) được lưu trữ tại Phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ. Vi khuẩn chỉ thị *Bacillus subtilis* NRBC 3134 từ Trung tâm Nghiên cứu nguồn sinh học RIKEN (Nhật Bản). Hóa chất được sử dụng bao gồm bộ nhuộm Gram, thuốc thử catalase và oxidase (Công ty Nam Khoa Biotech, Việt Nam); môi trường MRS và môi trường NB (Nutrient Broth) (Merck, Đức). Các hóa chất phân tích axit tổng gồm NaOH 0,1 N (Việt Nam) và phenolphthalein (Merck, Đức). Bưởi Năm Roi, đu đủ, khế, dầu thực vật, củ dền, tỏi, đường, bột ngọt và muối được mua ở các siêu thị của Cần Thơ.

2.2. Phân lập và kiểm tra các đặc điểm của vi khuẩn từ nem chua

Mười gram mẫu của mỗi loại nem chua được cho vào các bình tam giác có chứa 90ml môi trường MRS, ủ ở 37°C trong 24 giờ. Sau đó, dịch nuôi cấy được pha loãng và trải 0,1ml lên bề mặt đĩa MRS agar (có chứa 0,5% CaCO₃) và ủ ở 37°C. Sau 48 giờ, những khuẩn lạc có vùng phân giải CaCO₃ và đặc trưng cho vi khuẩn lactic được cấy truyền nhiều lần cho đến khi độ thuần vi khuẩn được xác định (Khunajakr & cs., 2008). Sau khi thu được các chủng vi khuẩn

thuần, tiến hành xác định các đặc điểm hình thái và sinh hóa như nhuộm Gram, xác định hình dạng và kích thước, khả năng di động và hoạt tính catalase và oxidase (Axelsson, 2004).

2.3. Khảo sát khả năng kháng khuẩn của các chủng vi khuẩn lactic được phân lập

Các chủng vi khuẩn lactic thuần chủng được kiểm tra khả năng đối kháng của với chủng *B. subtilis* bằng phương pháp vạch thẳng vuông góc (Annuk, 2003). Đầu tiên, các chủng vi khuẩn lactic khảo sát được cấy dọc theo đường kính của đĩa thạch MRS có bổ sung 0,2% CaCO_3 và ủ ở 37°C. Sau 24 giờ, vi khuẩn *B. subtilis* sẽ được cấy theo đường thẳng vuông góc với đường vi khuẩn đã mọc (cấy từ mép đĩa petri vào trong), tiếp tục ủ ở 37°C trong 24 giờ. Khoảng kháng khuẩn được tính bằng cách đo từ mép vạch thẳng cấy vi khuẩn lactic đến vị trí gần nhất của khuẩn lạc chủng vi khuẩn chỉ thị phát triển trên môi trường thạch (Hutt & cs., 2006).

2.4. Khảo sát khả năng lên men của các chủng vi khuẩn lactic

Các chủng vi khuẩn lactic phân lập và các chủng lưu trữ được tăng sinh trong môi trường MRS ở 37°C trong 24 giờ. Sau đó, 5% dịch tăng sinh được chủng vào môi trường MRS có bổ sung D-glucose (20 g/l) và lên men ở 37°C. Hàm lượng axit tổng sau 3, 4 và 5 ngày lên men được xác định bằng phương pháp chuẩn độ sử dụng NaOH 0,1 N (Lê Thị Thanh Mai & cs., 2007).

2.5. Khảo sát khả năng lên men nem chua của các chủng vi khuẩn lactic tuyển chọn

Môi trường thử nghiệm là phần trắng của vỏ bưởi Năm Roi được cắt sợi và đu đủ bào sợi được trộn đều với nhau. Tổng khối lượng vỏ bưởi và đu đủ được phối trộn với 5% dầu thực vật; 5% nước tỏi; 5% nước khế; 2% đường; 1,5% bột ngọt; 10% nước củ dền (w/w). Hỗn hợp nguyên liệu sẽ được hấp trong 20 phút và giã nhuyễn để tạo khối đồng nhất. Bổ sung 0,4% v/v dịch tăng sinh của các chủng vi khuẩn lactic (10^9 tế bào/ml) vào các mẫu môi trường thử nghiệm đã chuẩn bị, trộn đều và ủ lên men trong 4 ngày. Đo pH và xác

định hàm lượng axit lactic sinh ra sau 4 ngày lên men bằng phương pháp chuẩn độ sử dụng NaOH 0,1 N (Lê Thị Thanh Mai & cs., 2007).

2.6. Định danh chủng vi khuẩn lactic

Các chủng vi khuẩn lactic có hoạt tính kháng khuẩn và sinh axit lactic cao được chọn để ly trích DNA và tiến hành khuếch đại trình tự 16S ribosomal RNA sử dụng cặp mồi 27F (5'TACGGTTA CCTTGTTACGACT-3') và 1492R (5'-AGA GTTTGATC-CTGGCTC-3') (William & cs., 1991). Trình tự DNA được so sánh với trình tự trên ngân hàng dữ liệu của Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia Mỹ (NCBI - Mỹ) bằng công cụ Nucleotide BLAST để xác định tên khoa học.

2.7. Phân tích thống kê và xử lý số liệu

Số liệu được thu thập, xử lý và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, Hoa Kỳ) và thống kê phân tích phương sai một yếu tố (one-way ANOVA) theo kiểm định Duncan bằng phần mềm Statgraphics Centurion XVI (Statpoint Technologies Inc., Hoa Kỳ).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

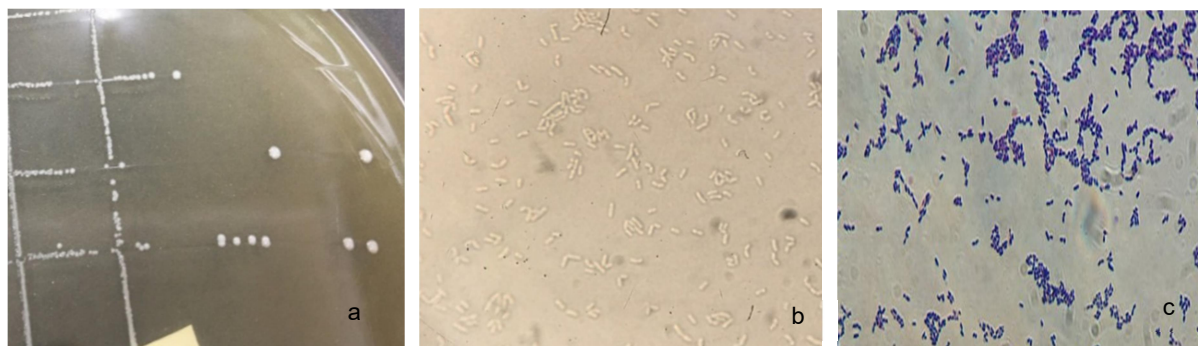
3.1. Kết quả phân lập và đặc điểm của các chủng vi khuẩn từ các mẫu nem chua

Mười ba chủng vi khuẩn đã được phân lập từ các mẫu nem chua gồm OM2, TP, LV, DT1, DT2, CR1, CR2, XP1, XP2, XP3, VL1, VL2, VL3. Quan sát trên bề mặt agar, tất cả các chủng này đều có khuẩn lạc dạng tròn đồng tâm, trắng sữa hoặc trắng hơi ngà, bề mặt trơn, lồi, mép phẳng. Khi quan sát dưới kính hiển vi, các chủng vi khuẩn có các dạng tế bào phổ biến như hình que và hình cầu (dạng đơn, đôi hoặc liên kết chuỗi). Trong đó, hình que chiếm đa số với 10/13 tổng số chủng phân lập được.

Kết quả nhuộm Gram cho thấy tế bào của các chủng vi khuẩn phân lập đều bắt màu xanh tím của thuốc nhuộm crystal violet. Thử nghiệm catalase và oxidase hầu hết đều cho kết quả âm tính. Riêng chủng DT1 có hiện tượng sủi bọt khi

kiểm tra với H_2O_2 (Bảng 1). Nhìn chung, qua một số thử nghiệm có thể thấy đặc điểm của các chủng vi khuẩn phân lập phù hợp với các đặc điểm điển hình của vi khuẩn lactic như phân giải

$CaCO_3$, khuẩn lạc có màu trắng sữa (trắng ngà), tròn, bóng, lồi, mép thẳng, tế bào có dạng hình que hoặc hình cầu, Gram dương, catalase và oxydase âm tính, không di động (Axelsson, 2004).



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc (a), tế bào chủng LV1 ở vật kính X100 (b) và mẫu nhuộm Gram của chủng CR1 (c) ở vật kính X100

Bảng 1. Đặc điểm điển hình về hình thái và sinh lý, sinh hóa của 13 chủng vi khuẩn lactic được phân lập từ các nem chua khác nhau

Địa điểm	Kí hiệu chủng	Đặc điểm khuẩn lạc	Dạng tế bào	Nhuộm Gram	Catalase	Oxidase	Tạo bào tử	Di động
Tiền Giang	OM2	Tròn, mép phẳng, độ nổi mô, bóng, láng, trắng sữa	Cầu, đôi, chuỗi	+	-	-	-	-
	TP	Tròn, mép phẳng, độ nổi mô, bóng, láng, trắng ngà	Que ngắn, đơn	+	-	-	-	-
Đồng Tháp	LV	Tròn, mép phẳng, độ nổi mô, bóng, láng, trắng ngà	Que ngắn, đơn	+	-	-	-	-
	DT1	Tròn, mép phẳng, độ nổi mô, bóng, láng, trắng sữa	Cầu, kết chuỗi	+	+	-	-	-
	DT2	Tròn, mép phẳng, độ nổi mô, bóng, láng, trắng sữa	Que ngắn, đơn	+	-	-	-	-
TP. Cần Thơ	CR1	Tròn, mép phẳng, độ nổi mô, bóng, láng, trắng ngà	Que ngắn, đơn	+	-	-	-	-
	CR2	Tròn, mép phẳng, độ nổi mô, bóng, láng, trắng ngà	Que dài, đơn	+	-	-	-	-
	XP1	Tròn, mép phẳng, độ nổi mô, bóng, láng, trắng ngà	Que ngắn, đơn	+	-	-	-	-
	XP2	Tròn, mép phẳng, độ nổi mô, bóng, láng, trắng ngà	Que ngắn, kết đôi	+	-	-	-	-
	XP3	Tròn, mép phẳng, độ nổi mô, bóng, láng, trắng ngà	Que ngắn, đơn	+	-	-	-	-
Vĩnh Long	VL1	Tròn, mép phẳng, độ nổi mô, bóng, láng, trắng sữa	Que ngắn, đơn	+	-	-	-	-
	VL2	Tròn, mép phẳng, độ nổi mô, bóng, láng, trắng sữa	Cầu, kết chuỗi	+	-	-	-	-
	VL3	Tròn, mép phẳng, độ nổi mô, bóng, láng, trắng sữa	Que ngắn, đơn	+	-	-	-	-

Ghi chú: (+): Dương tính và (-): Âm tính.

Bảng 2. Khả năng kháng *B. subtilis* của các chủng vi khuẩn lactic

Chủng	Vùng kháng khuẩn ¹ (mm)	Tính kháng khuẩn ²	Chủng	Vùng kháng khuẩn ¹ (mm)	Tính kháng khuẩn ²
OM2	6,33 ^c ± 0,58	+	CR1	9,67 ^b ± 0,58	+
TP	10,67 ^b ± 1,53	+	CR2	2,0 ^e ± 1,00	+
LV	5,67 ^{cd} ± 0,58	+	XP1	9,67 ^b ± 0,15	+
DT1	3,67 ^{de} ± 0,15	+	XP2	9,67 ^b ± 0,58	+
DT2	14,33 ^a ± 1,53	++	XP3	7,0 ^c ± 1,00	+
VL1	11,0 ^b ± 1,00	+	HCM	5,67 ^{cd} ± 0,58	+
VL2	13,67 ^a ± 0,15	++	L11	5,33 ^{cd} ± 0,58	+
VL3	9,33 ^b ± 0,58	+	L30	10 ^b ± 1,00	+

Ghi chú: ¹: Các mẫu tự phía trên giá trị trung bình trong cùng một cột khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 5%. Các số theo sau các giá trị trung bình là độ lệch chuẩn; ²: Mức độ xuất hiện khả năng tính kháng khuẩn: (+): <12mm; (++) : 12-25mm; (+++): >25mm.

3.2. Khả năng kháng khuẩn của các chủng vi khuẩn lactic được phân lập

Kết quả đánh giá khả năng kháng khuẩn của các chủng vi khuẩn lactic bao gồm 13 chủng phân lập và ba chủng vi khuẩn lactic lưu trữ tại phòng thí nghiệm bằng phương pháp vạch thẳng vuông góc được thể hiện ở bảng 2. Kết quả ghi nhận các chủng được khảo sát đều có hoạt tính kháng khuẩn. Trong đó, 2 chủng VL2 và DT2 có tính kháng khuẩn ở mức trung bình với chiều rộng vùng kháng khuẩn cao nhất lần lượt là 13,67mm và 14,33mm. Các chủng còn lại có tính kháng yếu hơn với chiều rộng vùng kháng khuẩn dao động trong khoảng 2-11mm.

Bảng 2 cho thấy 100% chủng vi khuẩn lactic phân lập thể hiện khả năng đối kháng với chủng vi khuẩn chỉ thị. Trong khi đó, kết quả của Ngô Thị Phương Dung & cs. (2011) đã xác định được 23/46 chủng vi khuẩn lactic được phân lập từ men tiêu hóa và thực phẩm lên men cũng thể hiện hoạt tính kháng khuẩn với *B. subtilis*. Hay nghiên cứu của Mezaini & cs. (2009) báo cáo rằng trong 20 chủng lactic phân lập từ sữa bò Algeria, chỉ có 6 chủng có hoạt tính chống các vi sinh gây bệnh (Mezaini & cs., 2009). Một nghiên cứu khác về các chủng vi khuẩn lactic được phân lập từ xúc xích lên men ở Đức cũng được đánh giá khả năng kháng khuẩn, trong số 169 chủng phân lập được thì chỉ có 12,4% kháng *Listeria innocua* DSM20649 và

L. monocytogenes DSM19094 (Bungenstock & cs., 2020). Nguyên nhân có thể là do sự khác nhau về loài, nguồn phân lập, khu vực địa lý hay các phương pháp để xác định hoạt tính kháng khuẩn. Nhìn chung, việc sử dụng các chủng vi khuẩn lactic mang đặc tính kháng khuẩn là một ưu thế để bảo quản cũng như sản xuất các loại thực phẩm lên men.

3.3. Khả năng lên men của các chủng vi khuẩn lactic trong môi trường MRS

Khả năng sinh axit lactic của các chủng vi khuẩn lactic khi lên men trong môi trường MRS lỏng sau 3, 4 và 5 ngày lên men được ghi nhận ở bảng 3. Kết quả cho thấy các chủng vi khuẩn đều có khả năng hình thành axit lactic cao. Hàm lượng axit lactic của 16 chủng vi khuẩn đạt được dao động trong khoảng 9,38-19,50 g/l sau 3 ngày lên men; 11,25-20,33 g/l sau 4 ngày lên men và 11,25-20,25 g/l sau ngày thứ 5. Cụ thể là có khoảng 50% chủng khảo sát tạo ra hàm lượng axit lactic theo xu hướng tăng từ 72 giờ đến 96 giờ và bắt đầu giảm sau 120 giờ. Điều này có thể giải thích là do vi khuẩn cần thời gian để dần thích nghi với môi trường và sau đó mới sinh trưởng và thực hiện một loạt các phản ứng để chuyển hóa đường thành axit lactic. Tuy nhiên, ở ngày thứ 5 đã ghi nhận sự suy giảm của hàm lượng axit lactic. Lúc này quá trình nuôi cấy đã bước vào pha suy vong, dinh dưỡng môi trường cạn kiệt tạo điều kiện bất lợi cho khả

năng tăng sinh vi khuẩn, dẫn đến khả năng lên men suy giảm (Leroy, 2001). Tuy nhiên, các chủng như LV, VL2, CR2, L11 và L30 lại có xu hướng tiếp tục tăng hàm lượng axit lactic ở ngày thứ 5. Bên cạnh đó, một số chủng như VL1 và CR1 lại ghi nhận sự suy giảm hàm lượng axit ở ngày thứ 4. Nguyên nhân có thể là do các đặc tính của các chủng có sự khác nhau để sinh trưởng và thích nghi với môi trường. Do đó, dựa vào các kết quả có thể chọn ngày thứ 4 để đánh giá hoạt tính lên men của các chủng vi khuẩn lactic.

Có thể thấy, sau 4 ngày lên men, các chủng bao gồm XP2, CR2, OM2 và TP đạt giá trị hàm lượng axit lactic cao nhất và khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với mức ý nghĩa 5% so với các chủng còn lại với các giá trị lần lượt là 20,33; 20,18; 19,88 và 19,60 g/l. Kết quả này có sự tương đồng với nghiên cứu của Nguyễn Thị Diễm Hương & Đỗ Thị Bích Thủy (2012) khi

nuôi cấy chủng *L. fermentum* DC1 trong môi trường MRS cho hàm lượng axit đạt 20,93 g/l và nghiên cứu của Trương Thị Thúy Nguyên & cs. (2020), khi nuôi cấy chủng HK221 được phân lập từ nem chua với lượng axit lactic sinh ra đạt 21,0 g/l.

3.4. Sản xuất nem chua từ chủng vi khuẩn lactic tuyển chọn

Một phát hiện khá thú vị là chủng DT2 tạo mùi hương rất thơm so với các chủng khác mặc dù khả năng sinh lactic chỉ đạt 11,78 g/l. Do đó, từ kết quả tuyển chọn ở bảng 3, thử nghiệm này được thực hiện nhằm đánh giá khả năng lên men nem chua từ củ bưởi bằng cách kết hợp 4 chủng có khả năng lên men tốt nhất (XP2, CR2, OM2 và TP; hàm lượng axit lactic trong khoảng 19,60-20,33 g/l) với chủng DT2 có hương thơm đặc trưng. Kết quả phân tích nem chua vỏ bưởi được tổng hợp trong bảng 4.

Bảng 3. Hàm lượng axit lactic sinh ra của các chủng vi khuẩn lactic sau 5 ngày

Chủng	Axit lactic (g/l)		
	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5
OM2	19,50 ^a ± 1,35	19,88 ^a ± 1,24	17,78 ^{cde} ± 0,13
TP	17,78 ^{bc} ± 0,22	19,60 ^a ± 0,13	18,83 ^b ± 0,13
LV	10,78 ^h ± 0,13	11,25 ^e ± 0,00	12,75 ^g ± 1,32
DT1	9,75 ⁱ ± 0,12	11,85 ^e ± 0,13	11,25 ^h ± 0,59
DT2	9,60 ⁱ ± 0,52	11,78 ^e ± 0,47	11,40 ^h ± 0,26
VL1	19,50 ^a ± 0,13	13,28 ^d ± 0,45	17,78 ⁱ ± 0,23
VL2	17,78 ⁱ ± 0,13	13,88 ^d ± 0,12	18,83 ^{hi} ± 0,68
VL3	10,78 ^{de} ± 0,39	18,08 ^b ± 0,67	12,75 ^{de} ± 0,94
CR1	17,25 ^c ± 0,47	16,86 ^c ± 0,34	16,43 ^e ± 0,45
CR2	14,70 ^f ± 0,12	20,18 ^a ± 0,91	20,25 ^a ± 0,00
XP1	17,70 ^{bc} ± 0,34	18,68 ^{bc} ± 0,22	17,18 ^{cde} ± 0,65
XP2	18,23 ^b ± 0,45	20,33 ^a ± 1,01	17,48 ^{cde} ± 0,65
XP3	16,35 ^d ± 0,13	17,18 ^{bc} ± 0,13	16,95 ^{de} ± 0,47
HCM	12,53 ^g ± 1,11	16,50 ^{cd} ± 0,35	14,93 ^f ± 0,35
L11	9,38 ⁱ ± 0,35	15,29 ^c ± 1,01	17,63 ^{cd} ± 0,47
L30	15,15 ^{ef} ± 0,14	17,08 ^{bc} ± 0,47	18,08 ^{bc} ± 0,47

Ghi chú: Các mẫu tự phía trên giá trị trung bình trong cùng một cột khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 5%. Các số theo sau các giá trị trung bình là độ lệch chuẩn.

Bảng 4. Hàm lượng axit lactic sinh ra của các cặp chủng vi khuẩn sau 4 ngày lên men trên môi trường thử nghiệm ở 37°C

Chủng LAB	Axit lactic (g/l)	pH sau lên men
CR2 - DT2	5,4 ^c ± 0,00	4,27 ^c ± 0,03
OM2 - DT2	8,4 ^b ± 0,51	4,09 ^b ± 0,02
XP2 - DT2	9,3 ^{ab} ± 0,37	4,05 ^{ab} ± 0,04
TP - DT2	9,9 ^a ± 0,95	4,03 ^a ± 0,01

Ghi chú: Các mẫu tự phía trên giá trị trung bình trong cùng một cột khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 5%. Các số theo sau các giá trị trung bình là độ lệch chuẩn.



Hình 2. Nem chua vỏ bưởi thành phẩm

Kết quả cho thấy hàm lượng axit lactic sau 4 ngày lên men ở các nghiệm thức nằm trong khoảng 5,4-9,9 g/l. Chủng CR2 kết hợp với chủng DT2 sinh ra lượng axit lactic thấp nhất với 5,4 g/l và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng còn lại. Trong khi đó, chủng TP kết hợp với chủng DT2 sinh ra lượng axit lactic cao nhất (9,9 g/l) nhưng khác biệt không có ý nghĩa so với các chủng XP2. Điều này cho thấy môi trường thử nghiệm lên men nem chua cùi bưởi là thích hợp để vi khuẩn lactic phát triển và hình thành axit lactic. Trong nghiên cứu của Sendra & cs. (2008) đã báo cáo các vi khuẩn lactic sử dụng vỏ cam và chanh để làm nguồn carbon cho quá trình lên men. Ngoài ra, nghiên cứu của Zain & Fazelin (2014) đã chứng minh phần cùi bưởi có đầy đủ nguồn chất dinh dưỡng cần thiết cho sự phát triển của vi khuẩn lactic khi báo cáo cho thấy cùi bưởi chứa 72,62% carbohydrate, 6,27% protein, 1,56% chất béo và 3,41% tro. Trong các quá trình lên men rau củ quả, vi khuẩn lactic phụ thuộc chủ yếu vào đường có sẵn trong thực vật và đường bổ sung để sản xuất axit lactic. Bên cạnh đó, các loại gia

vị như muối, đường, bột ngọt, tỏi và tiêu được bổ sung không chỉ giúp ức chế sự phát triển của các vi sinh vật không mong muốn khác mà còn góp phần làm tăng hương vị cuối cùng của sản phẩm (Montet & cs., 1999).

Sau 4 ngày lên men, giá trị pH của các chủng kết hợp không có sự chênh lệch nhiều (4,03-4,27). Trong đó, chủng TP kết hợp với chủng DT2 đạt giá trị pH thấp nhất (4,03) và khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với các chủng còn lại nhưng không khác biệt với chủng XP2 và DT2. Ngoài hàm lượng axit lactic sinh ra, giá trị pH cũng được đánh giá trong quá trình lên men thực phẩm do nó là thể hiện mức độ lên men của vi khuẩn lactic cũng như là yếu tố quan trọng để xác định thời gian bảo quản sản phẩm ở mức tương đối an toàn với các vi sinh vật có hại. Trong nghiên cứu lên men xúc xích thịt của Casaburi & cs. (2017) cho thấy chủng vi khuẩn lactic *L. curvatus* sau 3 ngày lên men thì giá trị pH giảm từ 6,3 xuống 5,05. Một nghiên cứu khác của Jabłońska-Rys & cs. (2016), sau quá trình lên men lactic 1 tuần, giá trị pH của nấm *Agaricus bisporus* giảm xuống

còn 3,60-3,75. Nhìn chung, sau 4 ngày lên men chủng TP và DT2 tạo ra lượng axit lactic cao nhất và cho giá trị pH thấp nhất nên sự kết hợp của hai chủng vi khuẩn này là phù hợp để ứng dụng trong quá trình lên men nem chua từ củ cải búp (Hình 2).

3.5. Định danh chủng vi khuẩn lactic

Hai chủng DT2 và TP có các đặc tính như kháng khuẩn tốt, sinh hương thơm và khả năng sinh axit lactic cao trong số các chủng LAB phân lập nên được chọn để định danh bằng phương pháp giải trình tự và phân tích trình tự gen 16S rRNA. Sau đó, đoạn gen này được so sánh với các gen 16S rRNA của vi khuẩn trong ngân hàng gen NCBI với phần mềm BLASTN. Kết quả cho thấy, đoạn gen 16S rRNA của chủng DT2 có độ tương đồng đến 99,59% so với trình tự của *Lactobacillus fermentum* và chủng TP có độ tương đồng đến 98,84% so với trình tự của *Lactobacillus plantarum* SN13T trên cơ sở dữ liệu GenBank của NCBI.

L. fermentum cũng giống như các loài thuộc vi khuẩn lactic khác được dùng làm giống khởi đầu cho quá trình lên men trong nhiều sản phẩm thực phẩm và đồ uống. Trong nghiên cứu của Cui & cs. (2019), khi nghiên cứu ảnh hưởng của các loài *Lactobacillus* trong quá trình lên men rau củ quả cho thấy *L. fermentum* có khả năng sử dụng carbohydrate trong rau củ tốt hơn các loài khác và đóng góp vai trò tiềm năng để tạo ra các hợp chất dễ bay hơi. Còn *L. plantarum* là một trong những loài chiếm số lượng lớn trong chi *Lactobacillus* và được nghiên cứu nhiều trong ngành công nghiệp thực phẩm với các tính năng công nghệ và dinh dưỡng được cải thiện. Ngoài ra, *L. plantarum* còn có khả năng kháng khuẩn tốt, giúp tăng tính an toàn và thời hạn sử dụng các sản phẩm lên men (Behera & cs., 2018).

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập được 13 chủng vi khuẩn lactic từ 7 mẫu nem chua. Tất cả các chủng phân lập đều có khả năng kháng khuẩn và sinh axit lactic cao trong môi trường MRS. Tuyển chọn được hai chủng TP và DT2 để thử

thử nghiệm sản xuất nem chua từ củ cải búp bằng cách đồng lên men hai chủng có các đặc tính như kháng khuẩn tốt, sinh hương thơm và khả năng sinh axit lactic cao đã tạo ra sản phẩm ở mức chấp nhận được với hàm lượng axit lactic cao nhất (9,9 g/l) và pH thấp nhất (4,03). Kết quả định danh đã xác định được 2 chủng DT2 và TP lần lượt là *L. fermentum* và *L. plantarum*. Từ đó, nghiên cứu cho thấy tiềm năng ứng dụng các chủng này vào quy trình sản xuất nem chua từ củ cải búp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Annuk H., Shchepetova J., Kullisaar T., Songisepp E., Zilmer M. & Mikelsaar M. (2003). Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidates. *Journal of Applied Microbiology*. 94(3): 403-412.
- Axelsson (2004). *Lactic acid bacteria: Classification & Physiology*. Microbiological and Functional Aspects, 3rd Edition, Marcel Dekker, New York. pp. 1-66.
- Behera S.S., Ray R.C. & Zdolec N. (2018). *Lactobacillus plantarum* with functional properties: an approach to increase safety and shelf-life of fermented foods. *BioMed Research International*. Article ID 9361614.
- Bungenstock L., Abdulmawjood A. & Reich F. (2020). Evaluation of antibacterial properties of acid lactic bacteria from traditionally and industrially produced fermented sausages from Germany. *Plos One*. 15(3): e0230345.
- Casaburi A., Aristoy M.C., Cavella S., Monaco R.D., Ercolini D., Toldra F., & Villani F. (2007). Biochemical and sensory characteristics of traditional fermented sausages of Vallo di Diano (Southern Italy) as affected by the use of starter cultures. *Meat Science*. 76(2): 295-307.
- Cui S., Zhao N., Lu W., Zhao F., Zheng S., Wang W. & Chen W. (2019). Effect of different *Lactobacillus* species on volatile and nonvolatile flavor compounds in juices fermentation. *Food Science and Nutrition*. 7(7): 2214-2223.
- Hutt P., Shchepetova J., Loivukene K., Kullisaar T. & Mikelsaar M. (2006). Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. *Journal of Applied Microbiology*. 100: 1324-1332.
- Huynh X.P., Huynh N.N.T., Bui H.D.L., Takeshi Z., Kenji S. & Ngo T.P.D. (2017). Selection of thermotolerant acid lactic bacteria producing high antibacterial activity and production of biomass

- from tofu sour liquid. *Can Tho University Journal of Science*. 07: 51-57.
- Jabłońska-Ryś E., Sławińska A., Radzki W. & Gustaw W. (2016). Evaluation of the potential use of probiotic strain *Lactobacillus plantarum* 299v in lactic fermentation of button mushroom fruiting bodies. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. 15(4): 399-407.
- Khunajakr N., Wongwicharn A., Moonmangmee D. & Tantipaiboonvut S. (2008). Screening and identification of axit lactic bacteria producing antimicrobial compounds from pig gastrointestinal tracts. *KMITL Science and Technology Journal*. 8(1): 8-17.
- Lê Thanh Mai, Nguyễn Thị Hiền, Phạm Thu Thủy, Nguyễn Thanh Hằng & Lê Thị Lan Chi. (2009). Các phương pháp phân tích ngành công nghệ lên men. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, Việt Nam.
- Leroy F. & De Vuyst L. (2001). Growth of the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* strain CTC 494 in MRS broth is strongly reduced due to nutrient exhaustion: a nutrient depletion model for the growth of axit lactic bacteria. *American Society for Microbiology Journal*. 67(10): 4407-4413.
- Meléndez-Martínez A.J., Britton G., Vicario I.M. & Heredia F.J. (2008). The complex carotenoid pattern of orange juices from concentrate. *Food Chemistry*. 109(3): 546-553.
- Mezaini A., Chihib N.E., Dilmli Bouras A., Nedjar-Arroume N. & Hornez J.P., (2009). Antibacterial activity of some axit lactic bacteria isolated from an Algerian dairy product. *Journal of Environmental and Public Health*. Article ID 678495.
- Montet D., Loiseau G., Zakhia N. & Mouquet C. (1999). Fermented fruits and vegetables. In: *Biotechnology: Food Fermentation*. Joshi, V.K. and Pandey, A. (eds.), vol. II. Edu. Publ. Distri., New Delhi. pp. 951-969.
- Ngô Thị Phương Dung, Huỳnh Xuân Phong & Huỳnh Thị Yến Ly (2011). Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn lactic có khả năng sinh chất kháng khuẩn. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 19a: 176-184.
- Nguyen H., Elegado F., Librojo-Basilio N., Mabesa R. & Dizon E. (2010). Isolation and characterisation of selected axit lactic bacteria for improved processing of Nem chua, a traditional fermented meat from Vietnam. *Beneficial Microbes*. 1(1): 67-74.
- Nguyễn Thị Diễm Hương & Đỗ Thị Bích Thủy (2012). Xác định và khảo sát một số tính chất có lợi của dòng *Lactobacillus fermentum* DC1 phân lập từ dưa cải Huế. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế*. 71(2): 177-187.
- Roussos P.A. (2011). Phytochemicals & antioxidant capacity of orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Salustiana) juice produced under organic and integrated farming system in Greece. *Scientia Horticulturae*. 129(2): 253-258.
- Sendra E., Fayos P., Lario Y., Fernández-López J., Sayas-Barberá E. & Pérez-Álvarez J. A. (2008). Incorporation of citrus fibers in fermented milk containing probiotic bacteria. *Food Microbiology*. 25(1): 13-21.
- Tambekar D.H., Bhutada S.A., Choudhary S.D. & Khond M.D. (2009). Assessment of potential probiotic bacteria isolated from milk of domestic animals. *Journal of Applied Biosciences*. 15: 815-819.
- Tocmo R., Pena-Fronteras J., Calumba K.F., Mendoza M. & Johnson J.J. (2020). Valorization of pomelo (*Citrus grandis* Osbeck) peel: A review of current utilization, phytochemistry, bioactivities, and mechanisms of action. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 19(4): 1969-2012.
- Torres S., Verón H., Contreras L. & Isla M.I. (2020). An overview of plant-autochthonous microorganisms and fermented vegetable foods. *Food Science and Human Wellness*. 9(2): 112-123.
- Trương Thị Thúy Nguyên, Lê Thị Minh Thư, Trần Ngọc Hân, Nguyễn Thị Mỹ Tiên, Mai Hoài Anh, Nguyễn Ngọc Thanh, Bùi Hoàng Đăng Long và Huỳnh Xuân Phong (2020). Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn lactic và ứng dụng trong lên men nem chua nắm rơm (*Volvariella volvacea*). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên*. 225(01): 3-10.
- William G., Susan M.B., Dale A.P., & David J.L. (1991). 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 173(2): 697-703.
- Zain M. & Fazelin N. (2014). Preparation and characterization of cellulose and nanocellulose from pomelo (*Citrus grandis*) albedo. *Journal of Nutrition & Food Sciences*. 5(1). Article ID 1000334.
- Zema D.A., Calabrò P.S., Folino A., Tamburino V.I.N.C.E.N.Z.O., Zappia G. & Zimbone S.M. (2018). Valorisation of citrus processing waste: A review. *Waste Management*. 80: 252-273.