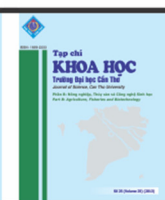




Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ
website: sj.ctu.edu.vn



ĐỊNH DANH VÀ XÁC ĐỊNH MỘT SỐ ĐẶC TÍNH SINH HÓA CỦA CÁC ĐỒNG VI KHUẨN LACTIC TRONG SẢN PHẨM MẮM CHUA CÁ SẶC

Đỗ Thị Tuyết Nhung¹, Nguyễn Văn Thành² và Nguyễn Hữu Hiệp²

¹ Trường Cao đẳng Kinh tế - Kỹ thuật Cần Thơ

² Viện Nghiên cứu & Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 20/03/2014

Ngày chấp nhận: 28/08/2014

Title:

Determination and characterization of biochemical parameters of lactic acid bacteria in sour fermented fish

Từ khóa:

Cá sặc, lên men, mắm chua, vi khuẩn lactic, xương mềm

Keywords:

Fermentation, gourami, lactic acid bacteria, soft bone, sour fermented fish

ABSTRACT

The traditional product, named “Mắm chua cá sặc” or “Mắm tiêu xương”, is a sour fermented soft bone fish (*Trichogaster trichopterus*; *Trichogaster microlepis*). Fish was mixed with salt, sugar, ethanol, grilled rice powder, garlic, chilli and naturally fermented at 28–30°C within 30 days. Fermented products had the harmonious combination of sweet, sour and salty taste; especially, they still remained the whole shape of fish but their skeleton turned really soft that it was boneless in the sense of taste. One of the factors affecting the quality of the product was the source of lactic acid bacteria presented to products. Therefore, it was necessary to isolate and determine lactic acid bacteria based on the characteristics of form, biochemistry and molecular biology techniques (DNA sequencing). These experiments were set up based on the basis of development of procedures for processing such as inoculating the bacteria into the products ... In this study, bacteria were isolated in fermented products on MRS medium with 6% of salt added. As a result, four isolated strains of bacteria including L1, L2, L3, L4 had whiter or milk-white colonies; 1-2mm in length; bacilli, diplococci and cocci in shape. All these four strains were Gram positive bacteria. Their reaction of catalase, oxidase were negative and positive to amylase; and especially, L1, L2 and L3 indicated positive results in protease. The results of 16S rRNA sequences of L1, L2, L3, L4 showed that they were *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus farciminis* and *Staphylococcus hominis* respectively. Among them, *Staphylococcus hominis* was not lactic acid bacteria.

TÓM TẮT

“Mắm chua cá sặc” hay “Mắm tiêu xương” là tên gọi dân gian của dạng sản phẩm cá sặc lên men. Cá sặc được phối trộn cùng với muối, đường, rượu, thính, gừng, tỏi, ớt và tiến hành lên men tự nhiên ở nhiệt độ 28-30°C trong thời gian khoảng 30 ngày. Một trong những yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm (mùi, vị, cấu trúc,...) đó chính là nguồn vi khuẩn lactic có trong sản phẩm. Vì vậy việc phân lập và xác định loài vi khuẩn lactic dựa trên đặc điểm về hình thái, đặc điểm sinh hóa 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 như chúng giống vi sinh vật vào sản phẩm,... Tiến hành phân lập vi khuẩn hiện diện trong sản phẩm trên môi trường MRS có bổ sung 6% muối. Bốn dòng vi khuẩn L1, L2, L3, L4 được phân lập với các đặc điểm khuẩn lạc màu trắng hoặc trắng sữa, đường kính khoảng 1-2 mm; tế bào hình que, hình cầu đôi hoặc cầu đơn. Cả bốn dòng vi khuẩn này đều là vi khuẩn Gram dương, cho kết quả âm tính với enzyme catalase, enzyme oxidase; dương tính với enzyme amylase; chỉ có ba dòng L1, L2, L3 dương tính với enzyme protease. Bốn dòng này có mức độ tương đồng về trình tự gen 16S rRNA trên 99% với các dòng vi sinh vật: *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus farciminis* và *Staphylococcus hominis*. Trong đó *Staphylococcus hominis* không phải là vi khuẩn lactic.

1 GIỚI THIỆU

Cá lên men là một trong những sản phẩm lên men truyền thống lâu đời và rất đặc trưng ở các quốc gia Đông Nam Á. Cá lên men có vai trò quan trọng trong bữa ăn của người dân nhất là người dân nghèo do có giá thành rẻ lại cung cấp thêm acid amin được thủy phân từ protein cá và có hương vị độc đáo (Hall, 2011). Ở nước ta sản phẩm cá lên men được gọi là “mắm”. Hầu hết những sản phẩm mắm lên men từ cá nhất là sản phẩm lên men từ các loại cá nhỏ như cá sặc, cá trèn,... các loại mắm này thường được dùng chủ yếu để nấu lấy hương vị như nấu lẩu, kho, chưng... ít khi được dùng phổ biến để “ăn sống” (không qua nấu) vì thịt ít, xương nhiều và cứng, thời gian sản xuất ra thành phẩm khá dài (từ vài tháng trở lên).

“Mắm chua cá sặc” cũng là dạng sản phẩm lên men cá. Nét đặc trưng của sản phẩm này là cá vẫn giữ được hình dạng nguyên vẹn nhưng xương rất mềm tạo cảm giác như không có xương khi ăn; mùi vị thơm ngon, hài hòa hơn các sản phẩm mắm thông thường khác nên không cần phối chế lại trước khi ăn và rất thích hợp dùng “ăn sống”, đặc biệt hơn là thời gian lên men ngắn khoảng 30 ngày. Đây cũng là dạng sản phẩm lên men lactic (Do Thi Tuyet Nhung et al., 2011).



Hình 1: Sản phẩm mắm chua cá sặc

Chụp ngày 17/10/2010

Tuy nhiên, bí quyết làm sản phẩm này đang dần thất truyền do mang tính chất gia truyền của gia đình. Đồng thời, nhiều yếu tố tác động lên sản phẩm chưa được nghiên cứu và xác định rõ ràng dẫn đến chất lượng sản phẩm không ổn định. Đối với sản phẩm lên men, vi sinh vật là một trong những nhân tố quan trọng có ảnh hưởng rất lớn đến quá trình phân giải sản phẩm. Vi sinh vật tham gia chủ yếu vào quá trình phân giải sản phẩm mắm cá là vi khuẩn với các giống chủ yếu: *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*,... Đến thời điểm hiện nay chưa có nhiều công trình khoa học công bố những vấn đề có liên quan đến sản phẩm mắm chua cá sặc. Vì vậy, việc phân lập các giống vi khuẩn tham gia vào quá trình phân giải là rất cần thiết nhằm cung cấp thêm thông tin khoa học về sản phẩm mắm của Việt Nam, phục vụ cho nghiên cứu, giảng dạy. Đồng thời, trên cơ sở

đó có những định hướng mang tính khoa học cho việc tối ưu hóa quy trình chế biến và có thể ứng dụng vào sản xuất để cho ra sản phẩm có chất lượng ổn định, không phụ thuộc nhiều vào điều kiện tự nhiên.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu

Nguyên liệu: cá sặc loại có kích thước vừa (khoảng 15-20g/con), được thu mua ở Long Mỹ - Hậu Giang.

Hóa chất: môi trường de Man Rogosa and Sharps (MRS agar và broth) của Ấn Độ, Sodium chloride (NaCl $\geq 99,5\%$) của công ty Guangdong-Trung Quốc, Tetramethyl - p - phenylenediamine dihydrochloride 1% và môi trường Luria-Bertani (LB) của Merck, Thermo Scientific GeneRuler 100bp plus DNA - ladder - USA.

2.2 Phương pháp

Chuẩn bị mẫu: xử lý nguyên liệu cá sặc (cắt bỏ vây, nội tạng, ngâm trong nước, sau đó chà vẩy và để ráo với tổng thời gian xử lý là 25 giờ); phối trộn cùng với 10% muối (có độ ẩm 1-1,5%), 15% đường (có độ ẩm 3-4,5%), 1% cồn thực phẩm (99,5%), 5% thính (có độ ẩm 1-1,5%), 10% (gừng, tỏi, ớt); cho vào hũ, đậy kín; ủ ở nhiệt độ phòng từ 28-30°C. Sau 10, 20, 30 ngày ủ, phân lập giống vi khuẩn trên môi trường MRS agar (có bổ sung 6% NaCl) ở nhiệt độ 37°C trong 48-72 giờ. Các khuẩn lạc sau khi phân lập xong được nhận diện để xác định loài trên cơ sở:

- *Xác định hình thái của các dòng vi khuẩn phân lập*: dựa vào đặc điểm hình thái khuẩn lạc; đặc điểm hình thái tế bào; nhuộm Gram

- *Khảo sát khả năng sinh enzyme của các dòng vi khuẩn phân lập*:

Khả năng sinh enzyme protease: sử dụng môi trường Luria-Bertani có bổ sung Skim milk để phát hiện khả năng sinh enzyme protease ngoại bào của các dòng vi khuẩn phân lập (Pailin et al., 2001).

Khả năng sinh enzyme amylase: khảo sát khả năng phân giải tinh bột dựa vào phản ứng màu với iodine (Nguyễn Đức Lượng và ctv., 2006).

Khả năng sinh enzyme catalase: dựa vào khả năng tạo bọt hay không tạo bọt của các dòng vi khuẩn khi cho khuẩn lạc vào dung dịch H_2O_2 3% (Karen, 2010).

Khả năng sinh enzyme oxidase: dựa vào khả năng làm thay đổi màu Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride của các dòng vi khuẩn (Patricia and Laura, 2010).


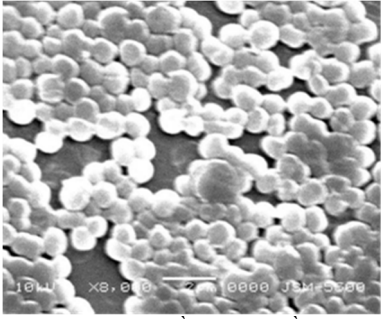
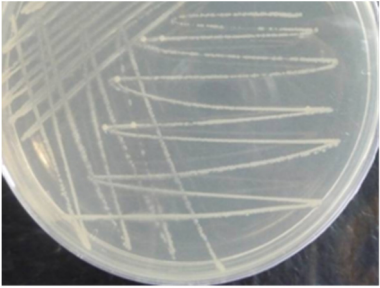
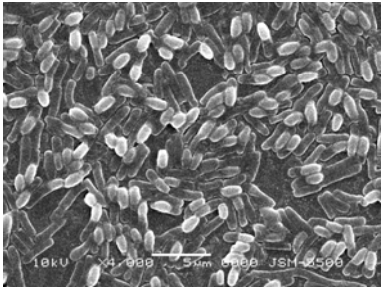
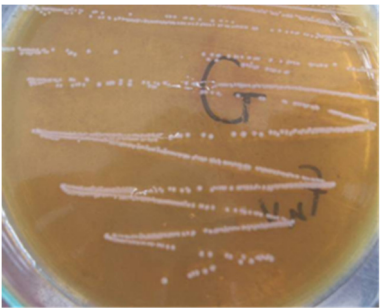
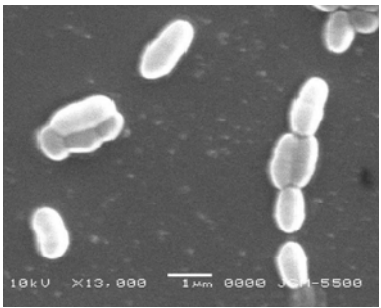
– Xác định loài của các dòng vi khuẩn phân lập bằng kỹ thuật sinh học phân tử (Sambrook and Russell, 2001): nhận diện các dòng vi sinh vật phân lập được bằng kỹ thuật giải trình tự trên hệ thống máy ABI 3130XL. Phân tích kết quả bằng phần mềm sequencing analysis 5.3 và so sánh kết quả trên ngân hàng Gen để tìm loài có quan hệ gần.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Đặc điểm về hình thái của các dòng vi khuẩn phân lập

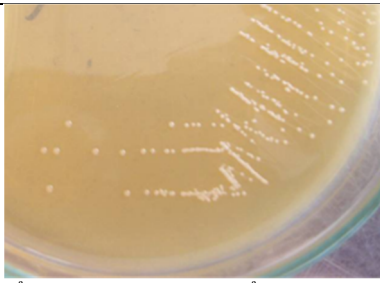
Kết quả có 4 dòng vi khuẩn Gram dương (ký

Bảng 1: Đặc điểm hình thái của 4 dòng vi khuẩn phân lập

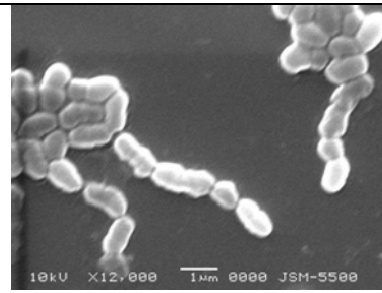
Dòng	Hình dạng và đặc điểm khuẩn lạc	Hình dạng và đặc điểm tế bào
L1	 Khuẩn lạc tròn, bóng, độ nổi mô, màu trắng sữa, bìa nguyên, đường kính 1,5-2 mm.	 Tế bào có dạng hình cầu đôi, ít cầu đơn, đường kính khoảng 1-2 μm , Gram dương.
L2	 Khuẩn lạc tròn bóng, màu trắng ngà, bìa nguyên, đường kính khoảng 0,6-1,0 mm.	 Tế bào là dạng hình que dài, đường kính khoảng (1-1,5) x (5-8) μm , Gram dương.
L3	 Khuẩn lạc bóng, độ nổi mô, màu trắng ngà, bìa răng cưa, đường kính 1-1,5 mm.	 Tế bào hình que ngắn, đường kính khoảng (1-1,5) x (4-6) μm , Gram dương.

hiệu L1, L2, L3, L4) với đặc điểm rất đặc trưng thường được dùng để nhận dạng các dòng vi khuẩn sinh acid lactic đã được *Salminen et al.*, (2004) mô tả như: vi khuẩn Gram dương; hình que hoặc hình cầu; trên môi trường MRS, khuẩn lạc màu trắng hoặc trắng sữa, đường kính khoảng 1-2 mm. Các đặc trưng này về hình thái khuẩn lạc và tế bào cũng đã được nhiều tác giả sử dụng để nhận dạng các dòng vi khuẩn LAB phân lập từ cá và tôm (*Parvathy and Puthuvallil*, 2005), từ nguyên liệu sữa (*Mahankumar and Murugalatha*, 2011),...

L4



Khuẩn lạc tròn bóng, độ nổi mô, màu trắng sữa, bìa nguyên, đường kính 0,5-1 mm.



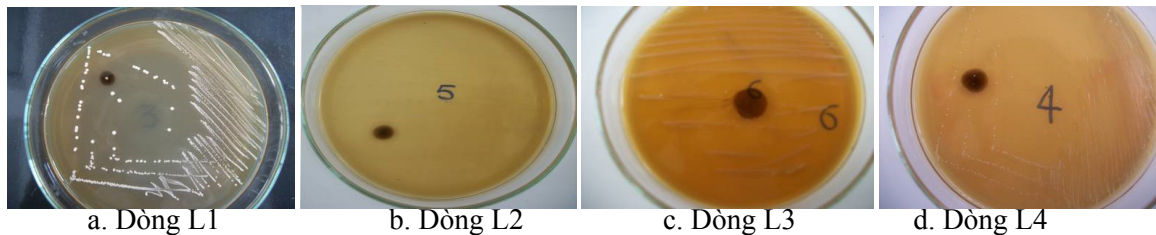
Tế bào có dạng hình cầu đơn, đường kính khoảng 1 μm, Gram dương.

Hình chụp ngày 29/5/2013

3.2 Khả năng sinh enzyme của các dòng vi khuẩn phân lập

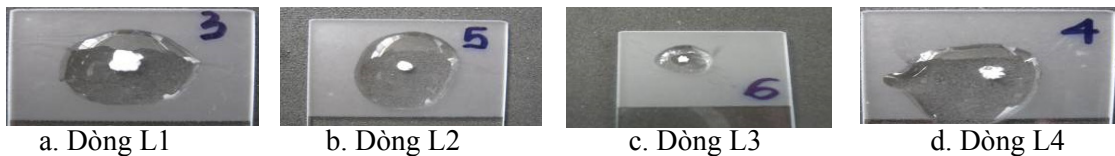
– Kết quả kiểm tra khả năng sinh enzyme oxidase và catalase: cả 4 dòng vi khuẩn phân lập

được đều có tính chất sinh hóa rất đặc trưng của vi khuẩn lactic: oxidase và catalase âm tính. Kết quả bằng hình ảnh được ghi nhận qua Hình 2 và Hình 3.



Hình 2: Hình ảnh về kết quả thử khả năng sinh enzyme oxidase của 4 dòng vi khuẩn

Bốn dòng L1, L2, L3, L4 không làm thay đổi màu thuốc thử Tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride cho kết quả thử: âm tính (Chụp ngày 29/5/2013)

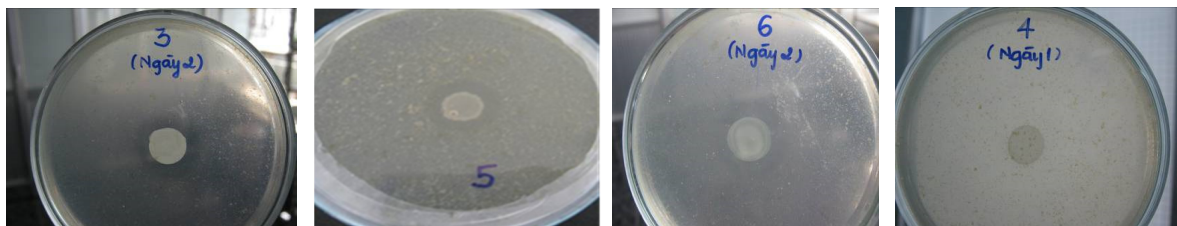


Hình 3: Hình ảnh về kết quả thử khả năng sinh enzyme catalase của 4 dòng vi khuẩn

Khi cho khuẩn lạc của bốn dòng L1, L2, L3, L4 vào dung dịch H₂O₂ 3%, không thấy xuất hiện hiện tượng tạo bọt: âm tính (Hình chụp ngày 29/5/2013)

– Kết quả kiểm tra khả năng sinh enzyme protease: có 3 dòng L1, L2 và L3 cho kết quả

dương tính với protease, còn lại dòng L4 cho kết quả âm tính (Hình 4).



Hình 4: Hình ảnh về kết quả thử khả năng sinh enzyme protease của 4 dòng vi khuẩn

Các dòng vi khuẩn tạo vòng sáng khi nuôi cấy trên môi trường Luria-Bertani có bổ sung Skim milk: dương tính (Hình chụp ngày 30/5/2013)

– Kết quả kiểm tra khả năng sinh enzyme amylase: bốn dòng vi khuẩn phân lập được đều cho

kết quả dương tính với amylase (Hình 5).



Hình 5: Kết quả thử amylase của 4 dòng vi khuẩn phân lập L1, L2, L3, L4

Các dòng khi chủng vào môi trường (Hình chụp ngày 30/5/2013)

Tổng hợp kết quả khảo sát một số đặc tính sinh hóa của bốn dòng vi khuẩn phân lập được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2: Bảng tổng hợp kết quả kiểm tra khả năng sinh enzyme của 4 dòng vi sinh vật phân lập

Dòng	Gram	Khả năng sinh enzyme			
		Catalase	Oxidase	Amylase	Protease
L1	+	-	-	+	+
L2	+	-	-	+	+
L3	+	-	-	+	+
L4	+	-	-	+	-

Theo *Nongpanga et al. (2008)*, tiêu chí quan trọng về tính chất sinh hóa trong việc xác định vi khuẩn lactic: tế bào Gram dương; thử hoạt tính enzyme catalase, oxidase cho kết quả âm tính. Bốn dòng vi khuẩn phân lập đều thỏa mãn tiêu chí này. Nhiều thí nghiệm phân lập vi khuẩn lactic từ sản phẩm lên men đã dùng tiêu chí này để bước đầu nhận dạng vi khuẩn lactic như phân lập LAB từ sữa đông và dưa leo (*Mahantesh et al., 2010*), phân lập *Lactobacillus delbreukii* từ sữa lên men (*Morami et al., 2013*), ...

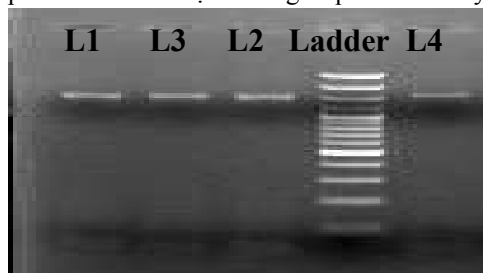
Ngoài ra, mắm chua cá sặc là sản phẩm cá lên men lactic. Do đó, trong quá trình lên men đòi hỏi phải có vi sinh vật tham gia quá trình chuyển hóa

carbohydrate thành acid lactic, đồng thời cũng phải có vi sinh vật phân giải protein thành acid amin. Như vậy, cả 4 dòng vi sinh vật trên đều có khả năng sử dụng nguồn carbohydrate trong sản phẩm, tuy nhiên chỉ có 3 dòng L1, L2, L3 có khả năng phân giải thịt cá. Đây là cơ sở quan trọng cho việc chọn giống vi khuẩn để chủng vào sản phẩm giúp quá trình lên men tốt hơn.

Mặc dù, phương pháp xác định LAB hiện nay vẫn dựa trên việc xác định hình thái, tuy nhiên, phương pháp này không phải lúc nào cũng đảm bảo độ chính xác mà có thể dẫn đến việc xác định sai. Ngày nay, việc áp dụng kỹ thuật PCR và giải trình tự gen 16S rRNA cho phép xác định nhanh chóng một lượng lớn vi sinh vật (*Rantsiou et al., 2006* và *Cocolin and Rantsiou, 2012*).

3.3 Nhận diện các dòng vi khuẩn phân lập bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Kết quả cho thấy bộ gen của vi khuẩn đã được trích ly thành công với sản phẩm PCR thu được có chất lượng tốt, băng rõ duy nhất cho mỗi dòng vi khuẩn trên gel điện di với kích thước đoạn gen khoảng 1500 bp (Hình 6). Giải trình tự gen 16S rRNA của bốn dòng vi khuẩn cho kết quả ở Bảng 3.



Hình 6: Phổ điện di của gen 16S rRNA của 4 dòng vi khuẩn và Ladder 100bp plus

Sử dụng cặp mồi (*William et al., 1991*)

1492R 5'-TACGGTTACCTTGTTACGACT-3'

27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3'

để khuếch đại trình tự vùng bảo tồn trên 16S rRNA của bốn dòng vi khuẩn phân lập.

Bảng 3: Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA của bốn dòng vi khuẩn

Dòng	Trình tự gen 16S rRNA
L1	GCAAGTCGAACGAACCTCCGTTAATTGATTATGACGTGCTTGCAGTGAATGAGATTT TAACACGAAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCAGAAGC AGGGGATAACACACTGGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAAACCGCCTGG TTTTCTTTAAAAGATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGGCAGTATAGC TAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGATGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGT AATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG GGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAG GGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACGTGGGTGAGAGTAACTGTTC ACCCAGTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG
L2	GCAAGTCGAACGAACCAAACTGTTGATTAAAGCTTGCTTTATGATTTCAGACCTTGGT GAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCAAAAGTGGGGGATAAC ATTTGGAAACAAGTGCTAATACCGCATAACAACACTACTTTCACATGATCGTAGCTTGA AAGATGGCTCTGCTATCACTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAG GTAATAGCTCACCAAGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACA TTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCA CAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATC GTAAAACTCTGTTGTTGAAGAAGAACATGCGTGAGAGTAACTGTTACGTACTGAC GGTATTCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG
L3	GCAAGTCGAACGAACCATCCTGTAGATTGAAGCTTGCTTCATGATTTCAGATTTTGGT GAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCAAAAGTGGGGGATAAC ATTTGGAAACAAGTGCTAATACCGCATAACAACACTACTTTCACATGATCGTAGCTTGA AAGATGGCTCTGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAG GTAATAGCTCACCAAGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACA TTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCA CAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATC GTAAAACTCTGTTGTTGAAGAAGAACATGCGTGAGAGTAACTGTTACGTACTGAC GGTATTCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG
L4	CGTCAGACGTGCACAGTTACTTACACGTTTGTCTTCCCTAATAACAGAGTTTTACG ATCCGAAGACCTTCATCACTACGCGGCGTGTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGCG GAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGT GGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGTATCGTTGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTA CCAAGTAGCTAATACGGCGCAGGTCCATCTATAAGTGATAGCAAAGCCATCTTTCAC TATCGAACCATGCGGTTTCGAAATATTATCCGGTATTAGCTCCGGTTTCCCGAAGTTA TCCCAGTCTTATAGGTAGGTTACCTACGTGTTACTACCCGTCGCCGCTAACGTCA AAGGAGCAAGCTCCTCGTCTGTTTCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGC GTTTCATCCTGAGCCAG

So sánh trình tự gen của bốn dòng vi khuẩn phân lập trên ngân hàng gen (www.ncbi.nlm.nih.gov) để xác định các loài có quan hệ gần. Kết quả được thể hiện ở Bảng 4.

Bảng 4: So sánh kết quả giải trình tự trên ngân hàng gen

Dòng	Mã gen	Các dòng so sánh	Mức độ tương đồng (%)	Loài được xác định
L1	JN836485.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain –O mls-1 16S ribosomal RNA	100	<i>Pediococcus acidilactici</i>
L2	HM130540.1	<i>Lactobacillus farciminis</i> strain Lf-10 16S rRNA gene	100	<i>Lactobacillus farciminis</i>
L3	AB626064.1	<i>Lactobacillus farciminis</i> gene for 16S rRNA, partial se	99	<i>Lactobacillus farciminis</i>
L4	AM779066.1	<i>Staphylococcus hominis</i> partial 16S rRNA gene, strain AK...	100	<i>Staphylococcus hominis</i>

Như vậy, bốn dòng vi sinh vật phân lập đã được nhận diện bằng kỹ thuật sinh học phân tử chỉ có 3 dòng (L1, L2, L3) là thuộc giống vi khuẩn lactic, dòng L4 không phải là vi khuẩn lactic. Kết quả phân lập trên cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của *Tanasupawat and Komagata (1995)* khi phân lập các dòng vi khuẩn từ sản phẩm lên men truyền thống (cá, thịt, rau quả,...) của Thái Lan: *Lactobacillus* spp. và *Pediococcus acidilactici* là các giống thường phân lập được và thỉnh thoảng cũng phân lập được giống *Staphylococcus*.

Các dòng vi khuẩn lactic phân lập được từ sản phẩm mắm chua cá sặc cũng là các dòng vi khuẩn đã được nhận diện trong sản phẩm cá lên men của Thái Lan như Pla – ra, Pla – som, trứng cá lên men (Mum-khai-pla),... Công thông tin trực tuyến NBRC của Thái Lan đã công bố công khai 221 chủng vi khuẩn lactic có nguồn gốc từ thực phẩm lên men của Thái Lan. Theo kết quả này thì *Lactobacillus farciminis* và *Pediococcus acidilactici* là 2 dòng vi khuẩn lactic rất phổ biến trong sản phẩm cá lên men, trong đó *Lactobacillus farciminis* chiếm tỉ lệ 74/221 và *Pediococcus acidilactici* chiếm tỉ lệ 7/221 trong tổng số 121 chủng đã được nhận diện. (<http://www.nbrc.nite.go.jp/e/thailact-e.html> truy cập ngày 20/5/2012).

Kiyohara et al. (2012) khi nghiên cứu về quần thể vi sinh vật hiện diện trong sản phẩm lên men từ cá muối và cơm (narezushi) thì nhận thấy vi khuẩn sinh acid lactic chiếm ưu thế nhưng trong đó mật số vi khuẩn *Lactobacillus* gia tăng đáng kể trong suốt quá trình lên men, trong khi đó mật số của những vi khuẩn khác gia tăng không đáng kể. Theo nghiên cứu của *Antonio et al. (2008)* về việc xác định động học của quần thể vi sinh vật hiện diện trong sản phẩm phô mai từ sữa cừu lên men (có tên gọi là Cueva de la Magahá) ở giai đoạn ủ chín. Kết quả ghi nhận *Lactobacillus paracasei* là loài chiếm ưu thế, và các loài *Lactobacillus* khác được tìm thấy ở giai đoạn đầu của quá trình ủ chín. Các dòng không phải vi khuẩn acid lactic như *Kocuria* và *Staphylococcus* thì được phát hiện ở giai đoạn cuối của quá trình ủ chín.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

4.1 Kết luận

Bốn dòng vi khuẩn được phân lập từ sản phẩm cá sặc lên men chua, xương mềm có các đặc điểm về hình thái: khuẩn lạc màu trắng hoặc trắng sữa, đường kính khoảng 1-2 mm; tế bào hình que, hình cầu đôi hoặc hình cầu đơn.

Cả bốn dòng vi khuẩn phân lập được đều là vi khuẩn Gram dương, cho kết quả âm tính với enzyme catalase, enzyme oxidase; dương tính với enzyme amylase và chỉ có 3 dòng L1, L2, L3 cho kết quả dương tính với enzyme protease.

Bốn dòng này có mức độ tương đồng về trình tự gen 16S rRNA trên 99% với các dòng vi sinh vật: *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus farciminis* và *Staphylococcus hominis*.

4.2 Đề xuất

Khảo sát khả năng sử dụng đường glucose, đường succrose, tinh bột của các dòng vi khuẩn trên để làm cơ sở cho việc chọn giống vi khuẩn chủng vào sản phẩm.

Phân lập và khảo sát vai trò của các dòng vi sinh vật khác (nấm men, nấm mốc,...) có trong sản phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Antonio M. Martín-Platero, Eva Valdivia, Mercedes Maqueda, Inés Martín-Sánchez, and Manuel Martínez-Bueno, 2008. Polyphasic approach to bacterial dynamics during the ripening of Spanish farmhouse cheese, Using Culture-Dependent and -Independent Methods. Appl Environ Microbiol. September; 74(18): 5662–5673
2. Cocolin L. and Rantsiou K., 2012. Meat Fermentation. In: Hui YH, editor. Handbook of meat and meat processing, Second Edition. CRC Press, 557-572.
3. Do Thi Tuyet Nhung, Luong Uyen Uyen and Nguyen Huu Hiep, 2011. Construction of the sour fermented fish (*Trichogaster trichopterus*) processing. Vietnam Academy of Science and Technology - Journal of Science and Technology, vol. 49 (1A): 232-237.
4. Hall G. M., 2011. Fish processing sustainability and new opportunities. Wiley-Blackwell, UK.
5. <http://www.nbrc.nite.go.jp/e/thailact-e.html> truy cập ngày 20/5/2012
6. Karen R., 2010. Catalase test protocol. ASM Microbelibrary.
7. Kiyohara M., Koyanagi T., Matsui H., Yamamoto K., Take H., Katsuyama Y., Miyamae H., Kondo T., Nakamura S., Katayama T. and Kumagai H., 2012. Changes in microbion population during fermentation of narezushi as revealed by

- pyrosequencing analysis. Biosci. Biotechnol. Biochem, 76(1): 48-52.
8. Nguyễn Đức Lượng, Phan Thị Huyền và Nguyễn Ánh Tuyết, 2006. Thí nghiệm công nghệ sinh học (tập 2) – Thí nghiệm vi sinh vật học. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh, 112-114.
9. Mahantesh M P., Ajay P., T A. and Ramana K.V., 2010. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from curd and cucumber. Indian Journal of Biotechnology. 9: 166-172.
10. Mohankumar A. and Murugalatha N., 2011. Characterization and antibacterial activity of bacteriocin producing *Lactobacillus* isolated from raw cattle milk sample. International Journal of Biology Vol. 3, No. 3, 128-143.
11. Morami D., Jeyanthi R.L. and Sumathy S., 2013. Bactericidal activity of the lactic acid bacteria *Lactobacillus delbreukii*. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 5(2):176-180.
12. Nongpanga K., Aporn W., Duangtip M. and Sukon T., 2008. Screening and identification of acid lactic bacteria producing antimicrobial compounds from pig gastrointestinal tracts. KMITL Sci. Tech. J. Vol. 8 No. 1 jan.
13. Pailin T., Kang D.H., Schmidt K. and Fung D.Y.C., 2001. Detection of extracellular bound proteinase in EPS-producing lactic acid bacteria cultures on skim milk agar. Lett Appl Microbiol. 33: 45-49.
14. Patricia S. and Laura C., 2010. Oxidase test protocol. ASM Microbelibrary.
15. Parvathy S.N. and Puthuvallil K.S., 2005. Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from fish and prawn. Journal of Culture Collections, Volume 4, No. 1, 48-52.
16. Rantsiou K. and Cocolin L., 2006. New developments in the study of the microbiota of naturally fermented sausages as determined by molecular methods: A Review. Int. J. Food Microbiol. 108: 255-267.
17. Sambrook J. and Russell P.W., 2001. Molecular cloning. A laboratory Manual Cold Spring Harbor, NY: CSHL Press.
18. Salminen S., Wright A., V. and Ouwehand A., 2004. Lactic acid bacteria Microbiological and Functional Aspect. Third edition, Revised and Expanded by Marcel Dekker, Inc.
19. Tanasupawat S., Okada S. and Komagata K., 1998. Lactic acid bacteria found in fermented fish in Thailand. J. Gen. Appl. Microbiol 44: 193-200.
20. William G. W., Susan M. B., Dale A. P. and David J. L., 1991. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology, vol 173, No 2, 697-703.