

## PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN DÒNG VI KHUẨN LACTIC CÓ KHẢ NĂNG KHÁNG KHUẨN TỪ ĐƯA LÊ NON (*Cucumis melo* L.) MUỐI CHUA

Huỳnh Ngọc Tâm<sup>1</sup>, Trần Thanh Trúc<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Mười<sup>1</sup> và Hà Thanh Toàn<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Trường Đại học Cần Thơ

### Thông tin chung:

Ngày nhận: 05/08/2016

Ngày chấp nhận: 24/10/2016

### Title:

Selection of antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from fermented small melon (*Cucumis melo* L.)

### Từ khóa:

Đưa lê non muối chua, kháng khuẩn, tuyển chọn, vi khuẩn acid lactic, vi khuẩn chỉ thị

### Keywords:

Antibacterial activity, fermented small melon, indicator bacteria, lactic acid bacteria, selection

### ABSTRACT

The study was carried out with the purpose of isolation and selection of lactic acid bacterial strains which have highly antibacterial activity from fermented small melon (*Cucumis melo* L.). This was the basis for the improvement and enhancement of the quality of fermented products. Lactic acid bacteria (LAB) was isolated from fermented small melon at various fermentation periods. It was found that 19 isolates had opalescent or milky white colonies, rod cells, spherical and chain cells and exhibited a clear zone and growth on MRS agar supplemented with CaCO<sub>3</sub>. Only 9 strains showed good inhibition zone diameters on agar when *Bacillus subtilis*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were used as indicators for detection of antagonistic activity. The strains which exhibited the widest zones of inhibition against all the indicator were L22, L61, L64 and L123. Using 16s rDNA sequence analysis, L22 was identified as *P. acidilactici*, while L123, L61, L64 were similar levels over 99% of the 16S rRNA gene sequence with *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus brevis*, respectively.

### TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện với mục đích phân lập các dòng vi khuẩn lên men lactic hiện diện trong dưa lê non (*Cucumis melo* L.) muối chua và tuyển chọn dòng có khả năng kháng khuẩn cao. Vi khuẩn acid lactic (LAB) được phân lập từ các mẫu dưa lê non muối chua ở các ngày lên men khác nhau. Kết quả đã phân lập được 19 dòng có khuẩn lạc trắng đục hoặc trắng ngà, tế bào hình que, hình cầu đơn hoặc chuỗi, Gram dương, không di động, catalase và oxidase âm tính, có vùng phân giải rõ và phát triển trên môi trường MRS có bổ sung CaCO<sub>3</sub>. Trong đó, 9 dòng có khả năng sinh bacteriocin kháng 4 dòng vi khuẩn chỉ thị (*Bacillus subtilis*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*). Các dòng có đường kính vòng kháng khuẩn lớn và khác biệt có ý nghĩa thống kê với các dòng khác là dòng L22, L61, L64 và L123. Tiến hành định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử, sử dụng kỹ thuật giải trình tự 16S rRNA, dòng L22 được xác định là *Pediococcus acidilactici*, ba dòng vi khuẩn L61, L64 và L123 có mức độ tương đồng trên 99% về trình tự gen 16S rRNA lần lượt với các dòng *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* và *Lactobacillus brevis*.

Trích dẫn: Huỳnh Ngọc Tâm, Trần Thanh Trúc, Nguyễn Văn Mười và Hà Thanh Toàn, 2016. Phân lập và tuyển chọn dòng vi khuẩn lactic có khả năng kháng khuẩn từ dưa lê non (*Cucumis melo* L.) muối chua. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. Số chuyên đề: Nông nghiệp (Tập 1): 18-24.

### 1 GIỚI THIỆU

Muối chua rau quả là biện pháp bảo quản truyền thống được sử dụng nhiều ở các nước

phương Đông và những nước chưa phát triển trên thế giới (Arimah *et al.*, 2014). Ở Việt Nam, các loại rau muối chua thường được sản xuất theo quy

mô thu công tại gia đình, quá trình lên men được thực hiện trong điều kiện tự nhiên nên chất lượng sản phẩm thường không ổn định, các thông số kỹ thuật ảnh hưởng đến quá trình lên men chưa được xác định rõ. Đối với sản phẩm lên men, vi sinh vật là một trong những nhân tố quan trọng có ảnh hưởng rất lớn đến chất lượng sản phẩm (Nguyễn Văn Mười và *ctv.*, 2013). Đến nay chưa có nghiên cứu công bố về sự hiện diện của vi khuẩn lactic trong sản phẩm dưa lê muối chua sau quá trình lên men. Vì vậy, việc phân lập và xác định loài vi khuẩn tham gia vào quá trình chuyển hóa đường từ loại nguyên liệu dưa lê là cần thiết nhằm cung cấp và bổ sung thông tin khoa học về sản phẩm rau quả lên men lactic này.

Các nghiên cứu trong những thập niên gần đây cho rằng nhóm vi khuẩn sinh acid lactic (LAB) có tiềm năng bảo quản thực phẩm nhờ khả năng sản sinh các chất kháng khuẩn trong quá trình sinh trưởng và phát triển (Bernet-Camard *et al.*, 1997). Nghiên cứu sản xuất các chất bảo quản thực phẩm theo hướng sinh học phần lớn đều tập trung vào bacteriocin của LAB do tính chất an toàn đối với con người và cá động vật. Điều này đã cho thấy khả năng ứng dụng nguồn LAB được phân lập từ các sản phẩm lên men truyền thống vào việc chế biến và bảo quản thực phẩm vì có khả năng sinh bacteriocin cao. Nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu phân lập, tuyển chọn và nhận diện nguồn vi khuẩn lactic có khả năng sinh chất kháng khuẩn từ dưa lê muối chua, nhằm cung cấp và bổ sung thông tin khoa học về sản phẩm rau quả lên men lactic này.

## 2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Phương tiện

Mẫu dưa lê non được thu hoạch từ khu thực nghiệm nông nghiệp, Bộ môn Khoa học cây trồng, Trường Đại học Cần Thơ. Độ tuổi thu hoạch trung bình từ 6÷12 ngày tính từ khi được thụ phấn, khối lượng trung bình từ 80÷150 g/trái.

Hóa chất: môi trường de Man Rogosa and Sharsp (MRS agar và broth) của Ấn Độ; nước mắt – peptone; hóa chất dùng trong nhuộm Gram; thuốc thử oxidase, catalase.

Bốn dòng vi khuẩn gây bệnh được sử dụng trong nghiên cứu gồm hai vi khuẩn Gram âm (*Escherichia coli* – ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* – ATCC 13076); hai vi khuẩn Gram dương (*Staphylococcus aureus* – ATCC 25923, *Bacillus subtilis* – ATCC 25924).

## 2.2 Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1 Phương pháp chuẩn bị dưa lê non muối chua

Mẫu dưa lê được xử lý sơ bộ (cắt bỏ cuống, loại bỏ cánh hoa còn sót lại), lựa chọn trái có khối lượng nằm trong khoảng từ 80÷150 g/trái và đem chần ở nhiệt độ 75°C trong thời gian 3 phút. Tỷ lệ khối lượng nguyên liệu và nước chần là 1 kg nguyên liệu/10 lít nước chần. Sau đó, dùng nước sạch để làm nguội, để ráo và cho dưa lê non vào dụng cụ lên men. Bổ sung dung dịch nước muối NaCl 4% đã thanh trùng để nguội, tỷ lệ nguyên liệu và dung dịch muối là 1: 1,5 (w/v). Tiến hành lên men ở nhiệt độ phòng (30±2°C) với thời gian lên men 12 ngày (Nguyễn Văn Mười và *ctv.*, 2013).

Thành phần hóa lý ban đầu của dưa lê non và sản phẩm muối chua (sau 12 ngày lên men) được xác định theo các phương pháp tiêu chuẩn, bao gồm độ ẩm (%), NPKL số 57-1994), acid tổng số (%), TCVN 4589-1988), đường tổng số (%), TCVN 4594-1988) và vitamin C (mg%, phương pháp Muri).

### 2.2.2 Phân lập vi khuẩn lactic từ dưa lê non muối chua

Quá trình lên men lactic từ rau quả gồm 3 giai đoạn đầu, giai đoạn chuyển hóa chính và giai đoạn kết thúc quá trình lên men khi pH sản phẩm đạt từ 3,3÷3,5. Các mẫu muối chua bao gồm dưa lê và dịch lên men ở các ngày lên men thứ 2, 4, 6, 8, 10 và 12 (kết thúc quá trình lên men), được xay nhuyễn bằng máy xay mẫu để đồng nhất mẫu. Tiến hành pha loãng đến  $10^{-4}$  và cho 0,1 mL mẫu vào đĩa petri chứa môi trường MRS agar có bổ sung 0,3% (w/v)  $CaCO_3$  (Hwanhlem *et al.*, 2011), ủ trong điều kiện yếm khí ở 37°C trong 24 giờ. Sau khi tăng sinh, pha loãng mẫu ở độ pha loãng  $10^{-3}$  và tiếp tục lấy 0,1 mL mẫu pha loãng cấy vào môi trường MRS agar ủ 37°C trong 24 giờ. Xác định các đặc điểm ban đầu về hình thái, màu sắc của vi khuẩn hiện diện (Arimah *et al.*, 2014). Quá trình cấy chuyển trên đĩa được lặp lại nhiều lần cho đến độ thuần được xác định. Các khuẩn lạc này nằm trên đường cấy chuyển, không lẫn với những khuẩn lạc có hình thái và màu sắc lạ. (Lê Thị Thùy Trang và Phạm Minh Nhựt, 2014; Ngô Thị Phương Dung và *ctv.*, 2011).

Vi khuẩn lactic được xác định khi những dòng phân lập có hình tròn hoặc hình que, không sinh bào tử, Gram dương, catalase âm tính, oxydase âm tính và phân giải được  $CaCO_3$  (Abee *et al.*, 1999; Ngô Thị Phương Dung và *ctv.*, 2011).

**2.2.3 Tuyển chọn dòng vi khuẩn lactic có tính kháng khuẩn cao**

Chuẩn bị dịch huyền phù của dòng chi thị đã được nuôi cấy qua 24 giờ với mật số  $10^9$  tế bào/mL. Dòng 10% dung dịch vi khuẩn này vào môi trường nước mắm - peptone 2% agar ở 50°C và tiến hành đổ đĩa. Những giếng nhỏ có đường kính 6 mm được tạo ra trên mặt môi trường bằng thanh kim loại vô trùng (Schillinger *et al.*, 1989).

Những dòng vi khuẩn lactic đã phát triển trong 2 mL MRS lỏng dưới điều kiện yếm khí trong 48 giờ, ly tâm 8.000 rpm trong 15 phút ở 4°C. Lấy phần nước trong của dung dịch sau ly tâm. Điều chỉnh dung dịch về pH 6,5 bằng NaOH 0,1 N và trữ lạnh ở 4°C. Thu được dung dịch có khả năng có bacteriocin thô. Lấy 80 µL dung dịch bacteriocin thô nhỏ vào mỗi giếng của đĩa thạch đã chứa dòng vi sinh vật chi thị. Tiến hành ủ mẫu ở 4°C trong 15 phút cho dung dịch trong giếng khuếch tán. Sau đó, đĩa được ủ ở 37°C cho vi khuẩn chi thị phát triển. Hoạt tính kháng khuẩn của các dòng vi khuẩn phân lập được tính bằng đường kính vòng kháng khuẩn. So sánh, chọn lựa các dòng vi khuẩn lactic có khả năng tạo ra đường kính vòng kháng khuẩn ở mức trung bình và cao đối với 4 dòng vi sinh vật chi thị (Hwanhlem *et al.*, 2011), cụ thể:

- *Salmonella enteritidis*: từ 15 mm (trung bình) đến > 40 mm (kháng khuẩn tốt).
- *Escherichia coli*: từ 15 mm (trung bình) đến > 50 mm (kháng khuẩn tốt).
- *Staphylococcus aureus*: từ 20 mm (kháng khuẩn tốt).
- *Bacillus subtilis*: đường kính vòng phân giải từ 5 mm thể hiện có khả năng kháng khuẩn.

**2.2.4 Định danh dòng vi khuẩn lactic bằng phương pháp giải trình tự 16S rRNA**

Xác định loài của dòng vi khuẩn đã phân lập có khả năng kháng khuẩn cao nhất bằng kỹ thuật sinh học phân tử, sử dụng kỹ thuật giải trình tự 16S rRNA với cặp mồi (của Hoa Kỳ).

+Primer (1492R):

5'-TACGGTTACCTTGTTACGACT-3'

+Primer (27F):

5'-AGAGTTTGATCTGGCTC-3'

Sản phẩm PCR được tinh sạch và xác định trình tự trên máy đọc trình tự ABI 3130XL. Các trình tự được so sánh với trật tự 16S rRNA của các loài được xác định trong ngân hàng gen NCBI để xác định đến tên loài (Sambrook *and* Russell, 2001).

**2.3 Phương pháp xử lý số liệu**

Số liệu được thu thập và xử lý bằng phần mềm thống kê Statgraphics Centurion 16.2. Phân tích phương sai (ANOVA) và kiểm định LSD để kết luận về sự sai khác giữa các nghiệm thức. Sử dụng phần mềm Blast N để so sánh tương đồng giữa các dòng vi khuẩn trong ngân hàng dữ liệu NCBI.

**3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**3.1 Thành phần hóa lý cơ bản của dưa lê non**

Thành phần nguyên liệu là một trong những yếu tố quan trọng quyết định đến chất lượng sản phẩm muối chua. Các thành phần hóa lý của nguyên liệu được trình bày ở Bảng 1.

**Bảng 1: Thành phần hóa lý cơ bản của dưa lê non trước và sau lên men (\*)**

Chỉ tiêu	Nguyên liệu ban đầu	Sau lên men
Độ ẩm (%)	93,17±0,15	85,23±0,24
Hàm lượng acid tổng số (%)	0,14±0,05	0,57±0,09
Hàm lượng đường tổng số (%)	1,73±0,07	0,22±0,05
Hàm lượng vitamin C, (mg%)	8,59±0,27	2,42±0,06

(\*) Kết quả là trung bình của 5 lần phân tích

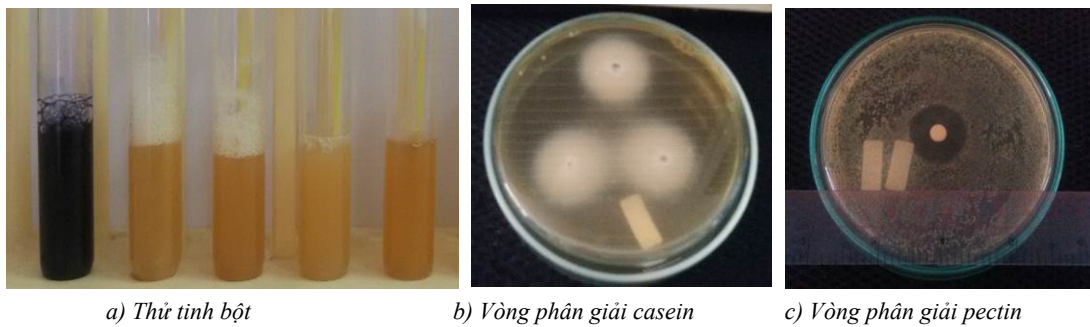
Kết quả phân tích ở Bảng 1 cho thấy, dưa lê có độ ẩm trung bình cao, đạt giá trị 93,17%. Hàm lượng acid toàn phần của dưa lê thấp từ 0,11÷0,13%, hàm lượng acid này phù hợp cho sự phát triển ban đầu của nhóm vi khuẩn lactic (Battcock *and* Azam-Ali, 2001). Hàm lượng đường trong dưa lê non là 1,73% và đủ cho sự hoạt động của nhóm vi khuẩn lactic. Theo Trần Minh Tâm (1998), lượng đường thích hợp cho muối chua rau quả vào khoảng 1,5÷3%. Hàm lượng vitamin C cao nhất ở mẫu có cỡ khối lượng 80÷150 g (10,59 mg%) và thấp nhất ở mẫu lớn hơn 150 g/trái (5,23 mg%). Nhìn chung, thành phần hóa học của dưa lê tương đối thích hợp cho quá trình muối chua. Sau 12 ngày lên men trong dung dịch 4% NaCl đã tạo sản phẩm có chất lượng tốt với màu sắc, hương vị đặc trưng, độ giòn cao hơn các sản phẩm lên men cùng loại, điều này cho thấy có sự hoạt động tốt của các vi khuẩn lactic tham gia vào quá trình lên men. Việc phân lập các dòng vi khuẩn lactic hiện diện tham gia vào quá trình muối chua dưa lê non cần được thực hiện.

**3.2 Phân lập các dòng vi khuẩn lactic hiện diện**

Kết quả đã phân lập được 19 dòng vi khuẩn với các đặc điểm như vi khuẩn Gram dương, không di động, không sinh bào tử, không phản ứng indole,

sinh acid lactic và phân giải CaCO<sub>3</sub>, catalase và oxidase âm tính (Đỗ Thị Tuyết Nhung và ctv.,

2014; Arimah *et al.*, 2014).



Hình 1: Khả năng sinh enzyme ngoại bào phân giải của dòng vi khuẩn đã phân lập

Bảng 2: Đặc điểm hình thái của các dòng vi khuẩn phân lập

Ngày lên men	Dòng phân lập	Hình thái tế bào vi khuẩn
2	L21	Que ngắn
	L22	Cầu kết đôi
4	L41	Cầu đơn
	L42	Que ngắn
	L43	Que dài
6	L61	Que ngắn
	L62	Que dài
	L63	Cầu đơn
	L64	Que ngắn
	L65	Cầu kết đôi, xếp chuỗi
8	L81	Que ngắn
	L82	Que ngắn
10	L101	Que dài
	L102	Que ngắn
	L103	Cầu đơn
	L104	Cầu kết đôi, xếp chuỗi
12	L121	Que dài
	L122	Que dài
	L123	Que ngắn

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy các khuẩn lạc của các dòng vi khuẩn có dạng hình que ngắn hay dài,

có một số vi khuẩn hình cầu đơn, kết đôi xếp thành chuỗi. Kết quả khảo sát các đặc tính sinh lý sinh hóa cho thấy, các dòng vi khuẩn sau khi tuyển chọn sơ bộ đều mang các đặc điểm: không di động, không sinh bào tử, không phản ứng indole, sinh acid lactic và phân giải CaCO<sub>3</sub>, catalase và oxidase âm tính (Đỗ Thị Tuyết Nhung và ctv., 2014; Arimah *et al.*, 2014).

Ngoài ra, các dòng vi khuẩn phân lập được đều cho kết quả dương tính với amylase nên có khả năng phân giải tinh bột, không có phản ứng chuyển sang màu xanh tím khi nhỏ dung dịch lugol vào môi trường nuôi cấy sinh chứa tinh bột. Khả năng phân giải casein và pectin được khảo sát bằng phương pháp đục lỗ môi trường thạch đĩa (Hình 1).

Sau 48 giờ nuôi cấy, sự phát triển của vi khuẩn lactic trên môi trường có bổ sung các cơ chất khác nhau đã tạo thành vòng phân giải xung quanh lỗ đục, điều này khẳng định vi khuẩn lactic phân lập được đều có khả năng phân giải casein và pectin.

### 3.3 Khả năng kháng với vi khuẩn chỉ thị và sinh enzyme ngoại bào

Kết quả kháng vi khuẩn chỉ thị của các dòng vi khuẩn lactic phân lập từ một số sản phẩm lên men được thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3: Vòng kháng vi khuẩn chỉ thị của các dòng vi khuẩn lactic

Dòng phân lập	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>B. subtilis</i> ATCC 25924
L22	27,27±1,78 <sup>d</sup>	25,98±1,93 <sup>d</sup>	16,76±1,67 <sup>d</sup>	7,40±1,62 <sup>b</sup>
L41	5,80±1,55 <sup>a</sup>	8,11±1,12 <sup>a</sup>	9,76±0,87 <sup>c</sup>	4,46±0,70 <sup>a</sup>
L61	46,81±2,31 <sup>f</sup>	34,93±1,49 <sup>e</sup>	27,84±1,83 <sup>f</sup>	13,45±1,77 <sup>c</sup>
L63	8,30±1,84 <sup>ab</sup>	6,30±1,09 <sup>a</sup>	5,50±0,98 <sup>a</sup>	5,30±0,96 <sup>ab</sup>
L64	21,69±2,33 <sup>c</sup>	15,41±1,88 <sup>c</sup>	19,85±2,45 <sup>c</sup>	9,84±1,39 <sup>d</sup>
L65	6,83±1,35 <sup>a</sup>	8,60±1,14 <sup>a</sup>	9,09±1,46 <sup>bc</sup>	4,49±1,48 <sup>a</sup>
L103	6,45±0,90 <sup>a</sup>	11,52±0,67 <sup>b</sup>	4,89±1,59 <sup>a</sup>	7,85±0,74 <sup>cd</sup>
L104	10,90±1,31 <sup>b</sup>	7,65±1,04 <sup>a</sup>	6,84±1,30 <sup>ab</sup>	7,23±1,72 <sup>bc</sup>
L123	35,36±2,42 <sup>c</sup>	43,05±1,75 <sup>f</sup>	35,25±2,04 <sup>g</sup>	17,32±1,35 <sup>c</sup>

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức khảo sát theo kiểm định Duncan ở mức độ tin cậy 95%

Kết quả từ Bảng 3 cho thấy, trong 19 dòng vi khuẩn phân lập, có 9 dòng thể hiện tính kháng khuẩn với cả 4 dòng vi sinh vật chỉ thị. Trong đó, dòng L123 có hoạt tính kháng khuẩn mạnh với các dòng vi sinh vật chỉ thị, cụ thể đối với *Salmonella enteritidis*, L123 thể hiện đường kính vòng phân giải > 40 mm, đạt 35,25 (> 20 mm) đối với *Staphylococcus aureus*, 17,32 mm trong trường hợp kháng hoạt động của *Bacillus subtilis* và thuộc nhóm kháng khuẩn trung bình đối với *Escherichia coli* (35,36 mm), kể đến là L61, L22 và L64. Tế bào vi khuẩn lactic đã chứa sẵn các hợp chất có tính kháng khuẩn như reuterin, reutericyclin, acid 2-Pyrrolidone-5-carboxylic và khi chúng sinh trưởng đã tạo ra thêm những thành phần kháng khuẩn khác bao gồm acid lactic, bacteriocin, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> và diacetyl (Smita *et al.*, 2014). Điều này góp

phần khẳng định tiềm năng sử dụng như một probiotic của các dòng LAB vừa phân lập từ dưa lê non. Những dòng vi khuẩn phân lập từ mẫu L22, L61, L64 và L123 có tính kháng khuẩn của bacteriocin mạnh hơn các dòng phân lập từ các ngày lên men khác.

### 3.4 Nhận diện dòng vi khuẩn bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Bốn dòng vi khuẩn lactic đã được tuyển chọn để định danh ở mức độ giống dựa vào phương pháp phổ điện di. Kết quả thu nhận cho thấy, vi khuẩn lactic phân lập từ dưa lê non muối chua bằng rõ duy nhất cho mỗi dòng vi khuẩn trên gel điện di với kích thước đoạn gen khoảng 1.500 bp. Kết quả phổ điện di của 4 dòng vi khuẩn thể hiện ở Hình 2.



Hình 2: Phổ điện di của gen 16S rRNA của 4 dòng vi khuẩn và Ladder 100 bp plus

Bốn dòng vi khuẩn được định danh bằng phương pháp giải, phân tích trình tự gen 16S rRNA và so sánh kết quả trên ngân hàng gen NCBI bằng

phần mềm Blastn của 4 dòng L22, L61, L64 và L123 được thể hiện Bảng 4.

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

Mẫu	Mã gen	Các dòng so sánh	Số base	Độ tương đồng	Loài xác định
L123	CP012650.1	<i>L.plantarum</i> strain HFC8	497	99%	<i>L.plantarum</i>
L22	KP742817.1	<i>P. acidilactici</i> strain E2-Pa	594	99%	<i>P. acidilactici</i>
L61	CP005958.1	<i>L. fermentum</i> F-6	590	100%	<i>L. fermentum</i>
L64	AP012167.1	<i>L. brevis</i> KB290	538	100%	<i>L. brevis</i>

Kết quả từ Bảng 4.18, bốn dòng có mức độ tương đồng về trình tự gen 16S rRNA với các dòng vi sinh vật: *Lactobacillus plantarum*; *Pediococcus acidilactici*; *Lactobacillus fermentum*; *Lactobacillus brevis*. Các dòng vi khuẩn được đặt tên tương ứng là *L. plantarum* L123, *P. acidilactici* L22; *L. fermentum* L61; *L. brevis* L64. Trình tự

gene 16S rRNA của dòng L22, L61, L64 và L123 được thể hiện ở Bảng 5.

Như vậy, bốn dòng vi sinh vật phân lập đã được nhận diện bằng kỹ thuật sinh học phân tử đều là thuộc giống vi khuẩn lactic. Nghiên cứu về hệ vi sinh vật hiện diện trong sản phẩm lên men cho thấy vi khuẩn sinh acid lactic chiếm ưu thế tăng nhanh trong suốt quá trình lên men.

**Bảng 5: Trình tự gene 16S rRNA của 4 dòng vi khuẩn**

Mẫu	Trình tự gene 16S rRNA của dòng L22, L61, L64 và LE123
L123	1 CTTTTGATAC TTTCGTGATC GGTAAAGGCA ATCAAATGGC CCATGCCGCT 51 GCGTTAGTTG TGTCGGAAGA ACCCGGCACC ATGTATAATC CGTTGTTTTT 101 CTACGGGGGC GTTGGTCTGG GAAAAACCCA CTAATGCAC GCTATCGGTA 151 ACAAATTGTT AGAAACCGAT CCGACTAGTA ACATTAAATA TGTGACTAGC 201 GAATCTTTTA CGAATGAATT AATTAATGCC ATTCAAACTA AAAAACAGGA 251 GGCGTTCCGC GAAGAATATC GGAACGTTGA CCTGTTATTA GTCGACGACA 301 TTCAATTTTT TGCCAATAAG GAAGCAACCC AAGAAGAGTT CTTCCATACA 351 TTTAATGCTT TATATGAAGA TGATAAGTAA ATCGTGCTTA CATCCGATCG 401 CTTACCGAAC GAAATTCGCG AACTCCAAGA TCGCCTAGTT TCTAGGTTTA 451 ACTGGGGATT ATCCGTTGAT ATTACCCAC CTGATCTCGA GACGCGG
L22	1 GGACGGGTGA GTACCACGTG GGTAACCTGC CCAGAAGCAG GGGATAACAC 51 CTGGAAACAG ATGCTAATAC CGTATAACAG AGAAAACCGC CTGGTTTTCT 101 TTTAAAAGAT GGCTCTGCTA TCACTTCTGG ATGGACCCGC GGCGCATTAG 151 CTAGTTGGTG AGGTAACGGC TCACCAAGGC GATGATGCGT AGCCGACCTG 201 AGAGGGTAAT CGGCCACATT GGGACTGAGA ACGGCCAGA CTCCTACGGG 251 AGGCAGCAGT AGGGAATCTT CCACAATGGA CGCAAGTCTG ATGGAGCAAC 301 GCCGCGTGAG TGAAGAAGGG TTTCGGCTCG TAAAGCTCTG TTGTTAAAGA 351 AGAACGTGGG TGAGAGTAAC TGTTACCCA GTGACGGTAT TTAACGGAA 401 AGCCACGGT AACTACGTGC CAGCAGCCGC GGTAAATACGT AGTGGCAAG 451 CGTTATCCG ATTTATTGGG CGTAAAGCGA GCGCAGGCCG TCTTTAAGT 501 CTAATGTGAA AGCCTTCGCG TCAACCGAAG AAGTGATTG GAACTGGGA 551 GACTTGAGTG CAGAAGAGGA CAGTGGA ACT CCATGTGTAG CGGT
L61	1 AAAAAAATT AATTGCTCCG GCAAACCCC TCGACTTCGC TAACGGCAGG 51 CTTGCGATCC AGCTGCCCTC CCAGTACCAC CGCGACTTTT GGGAGCAGT 101 GACCGACCAG GTCGTCGAAA TCGTCTACCA ACGCACCCGC CAAGAAATTC 151 GCCCGGACTA CGTGTTGGCA ACCGATCCGA CCCCCCTGGC CCAAACGCCG 201 CCCC GGCCAC AGTCGACCTT TAAAGAGGAA ACGCCCCTCA ACCCGGAGTA 251 CACCTTCAA ACCTTCATTG AAGGACGTAG CAACATGATG GCCTACGCTT 301 CAGCCTTTGC GGCTCCGAG TCCCCGGGTG ACCAGTACAA CCCGCTCCTG 351 ATTTACGGGG GCGTCGGCCT AGGCAAGACC CACTTGATGC AAGCCATCGC 401 TAACAACATG AAGTTTACA ACCTAGCGT ACGGATCAAG TACGTAACCA 451 GCGAAAATT CATGAACGAC TTCGTTAACT CGATTAAATC CGGGACCCAA 501 GAGGAGTCC GCCGCGAATA CCGCGACCTC GACGCCCTCT TGGTCGACGA 551 TATTCAGTTC TTCGCCTCCA AGGGGGAGAC GCAAACCGAA
L64	1 TTCTCGAAAA TGAACGTCAG CAACAGGCCA CCTTAAAAGC CAAAACCGCA 51 CCCGTTGCGG CTGGCGAACC GGTTGAACCG ACACCCACGT TTATGAAAGA 101 AACGGCGTTG AATCCCCTG ACACATTTGA CACCTTTGTC ATCGGAAAAG 151 GCAACCAAAT GGCCCATGCT GCGGCCTTGG TGGTCTCTGA AGAACCCGGC 201 GTGATGTACA ATCCGCTCTT CTTCTATGGT GGCGTTGGTC TGGGCAAGAC 251 CCACTTGATG CACGCGATCG GCAACAAAAT GTTAGAAGAT CGCCCCGACA 301 CCAAAGTTAA ATACGTGACT AGCGAAGCCT TCACGAATGA CTTTATTAAT 351 GCGATTCAA CTCGGACGCA GGAGCAGTTT AGACAGGAGT ATCGTAACGT 401 TGATCTGCTG CTGGTCGATG ATATTCAGTT CTTGCTAAT AAGGAAGGAA 451 CCAAGAGGA GTTCTTCCAT ACGTTTAAATG CGCTCTATGA TGATGGTAAA 501 CAAATCGTGC TCACCTCAGA TCGCTTACCC AACGAGAT

**4 KẾT LUẬN**

Từ quy trình chế biến dưa lê non muối chua bằng phương pháp lên men tự nhiên đã phân lập được 19 dòng vi khuẩn thể hiện các đặc điểm sinh hóa của vi khuẩn acid lactic: Gram dương không di động, không sinh bào tử, không phản ứng indole, sinh acid lactic và phân giải CaCO<sub>3</sub>, catalase và oxidase âm tính. Trong đó, 9 dòng có khả năng

sinh bacteriocin kháng lại vi khuẩn chỉ thị (*Salmonella enteritidis*, *S. aureus*, *B. subtilis* và *E. coli*), 4 dòng L22, L61, L64 và LE123 có khả năng kháng lại hoạt động của cả 4 dòng khuẩn chỉ thị ở mức trung bình và cao. Việc sử dụng kỹ thuật giải trình tự 16S rRNA cho thấy, dòng L22 được xác định là *Pediococcus acidilactici*, ba dòng vi khuẩn L61, L64 và L123 có mức độ tương đồng trên 99% về trình tự gen 16S rRNA lần lượt với các dòng

*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* và *Lactobacillus brevis*. Các dòng vi khuẩn có đặc tính probiotic từ những nguồn này còn có thể sử dụng trong các chế phẩm sinh học nếu được nghiên cứu có hệ thống.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abee, G., Tjakko, B., Beldman, J., Broek, R., Houben, F., Nout, S., Rombouts, F., Schoustra, J., Voragen, A., Wouters, N.P., 1999. Food fermentation part 1, Department of Food Technology and Nutritional Sciences, Wageningen Agriculture University.
- Anand, T.P., Bhat, A. W., Shouche, Y.S., Roy, U., Siddharth, J., Sarma S.P., 2006. Antimicrobial activity of marine bacteria associated with sponges from the waters off the coast of South East India. *Microbiological Research*. 161 (3): 252-262.
- Arimah, B.D., Ogunlowo, O.P., Adebayo, M.A., Jesumirhewe, C., 2014. Identification of Lactic acid Bacteria isolated from selected Nigerian Foods and Comparison of their Bacteriocins activities. *International Journal of ChemTech Research*. 6(2): 929-937.
- Battcock, M. and S. Azam-Ali, 2001. Fermented Fruits and Vegetables-A Global Perspective. *FAO Agricultural Services Bulletin*, 134: 7-12.
- Bernet-Camard, M.F., Liévin, V, Brassart, D, Neeser, J.R, Servin, A.L., Hudault, S., 1997. The human *Lactobacillus acidophilus* strain la1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance(s) active in-vitro and in-vivo. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(7): 2747-2753.
- Hwanhlem, N., S. Buradaleng, S. Wattanachant, S. Benjakul, A. Tani, S. Maneerat, 2011. Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains. *Food control*, 22:401-407
- Đỗ Thị Tuyết Nhung, Nguyễn Văn Thành và Nguyễn Hữu Hiệp, 2014. Nghiên cứu bổ sung giống vi khuẩn lactic trong chế biến mắm chua cá sặc. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 32: 9-16.
- Lê Ngọc Thùy Trang và Phạm Minh Nhựt, 2014. Phân lập và khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sản sinh hợp chất kháng khuẩn của *Lactobacillus plantarum*. *Tạp chí Sinh học*. 36(1): 97-106.
- Ngô Thị Phương Dung, Huỳnh Thị Yến Ly và Huỳnh Xuân Phong, 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.
- Nguyễn Thúy Hương và Trần Thị Tường An, 2008. Thu nhận bacteriocin bằng phương pháp lên men bởi tế bào *Lactococcus lactis* cố định trên chất mang cellulose vi khuẩn (BC) và ứng dụng trong bảo quản thịt tươi sơ chế tối thiểu. *Tạp chí phát triển Khoa học và Công nghệ*. 11(9): 100-109.
- Nguyễn Văn Mười, Nguyễn Ngọc Huỳnh Trân và Trần Thanh Trúc, 2013. Ảnh hưởng của kích cỡ nguyên liệu và khối lượng mẻ đến quá trình lên men lactic dưa leo. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. Phần B: Nông nghiệp, Thú y sản và Công nghệ Sinh học*: 28: 44-51.
- Oluwafemi, F., Adetunji, A.F., 2011. Health benefits of lactic acid bacteria *Candida albicans* against. *Journal of Biological Sciences Applications*. 41: 2836-2840.
- Petsuriyawong, B., Khunajakr, N., 2011. Screening of probiotic lactic acid bacteria from piglet feces. *Kasetsart Journal*. 45: 245-253.
- Sambrook, J., Russell, P.W., 2001. Molecular cloning. A laboratory Manual Cold Spring Harbor, NY: CSHL Press.
- Schillinger, U. and F. K. Lucke, 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*. 55(8): 1901-1906.
- Smita, N., M. G. Bodhankar and S. Vaijayanti, 2014. Screening of intestinal Lactic Acid Bacteria of breastfed neonates for antimicrobial activity against *Bacillus subtilis*, *Staph. aureus* and *E. coli*. *Research Journal of Chemistry and Environment*. 18(3): 37-41.
- Trần Minh Tâm, 1998. Các quá trình công nghệ trong chế biến nông sản thực phẩm. NXB Nông nghiệp thành phố Hồ Chí Minh, 296 trang.