

## XÁC ĐỊNH MẬT SỐ VÀ PHÂN LẬP VI SINH VẬT TRONG LÊN MEN CA CAO

Ngô Thị Phương Dung<sup>1</sup>, Nguyễn Ngọc Thanh<sup>1</sup> và Huỳnh Xuân Phong<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

### Thông tin chung:

Ngày nhận: 18/12/2012

Ngày chấp nhận: 22/03/2013

### Title:

Microflora composition and isolation of micro-organisms in cocoa fermentation

### Từ khóa:

Lên men ca cao, nấm men, nấm mốc, vi khuẩn acid acetic, vi khuẩn acid lactic

### Keywords:

Acid acetic bacteria, acid lactic bacteria, cocoa fermentation, moulds, yeasts

### ABSTRACT

This research was conducted with the aim to determine the microflora composition presented during the cocoa fermentation in Vietnam, from which, it can be applied as basic data for further research about the interaction of micro-organisms effecting on the fermentation and the use of defined inoculum starters for controlled qualified fermentation. The research results indicated that different kinds of micro-organisms were involved and changed in turn to be predominant population during the cocoa fermentation. The highest counts of each kind of micro-organisms were as follows: yeasts (6.40 log cfu/g), acid lactic bacteria (6.30 log cfu/g), acid acetic bacteria (7.30 log cfu/g), *Bacillus* (7.40 log cfu/g) and moulds (4.41 log cfu/g). The total aerobic bacteria reach highest (10.45 log cfu/g) after 4 days of fermentation. The isolation results were obtained including 20 yeasts, 13 moulds, 12 acid lactic bacteria and 14 acid acetic bacteria. By using macro- and micro-morphological examination and biochemistry analyses, different kinds of genera were characterized including: *Hanseniaspora*, *Saccharomyces* and *Brettanomyces* for yeasts; *Rhizopus* and *Aspergillus* for moulds; *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactococcus* and *Lactobacillus* for acid lactic bacteria; *Acetobacter* for acid acetic bacteria.

### TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định hệ vi sinh vật trong quá trình lên men ca cao ở Việt Nam, đây là cơ sở để tiến hành nghiên cứu sự tác động của từng loại vi sinh vật đến quá trình lên men và sử dụng các vi sinh vật này như là nguồn giống chủng để điều khiển quá trình lên men đạt được chất lượng tốt. Kết quả nghiên cứu cho thấy trong lên men ca cao có sự hiện diện của nhiều nhóm vi sinh vật khác nhau và chiếm ưu thế ở từng giai đoạn trong quá trình lên men. Mật số cao nhất của từng nhóm vi sinh vật được ghi nhận gồm có: nấm men (6,40 log cfu/g), vi khuẩn acid lactic (6,30 log cfu/g), vi khuẩn acid acetic (7,30 log cfu/g), vi khuẩn *Bacillus* (7,40 log cfu/g) và nấm mốc (4,41 log cfu/g). Tổng số vi khuẩn hiếu khí hiện diện cao nhất vào ngày thứ 4, đạt 10,45 log cfu/g. Kết quả phân lập được 20 dòng nấm men, 13 dòng nấm mốc, 12 dòng vi khuẩn acid lactic và 14 dòng vi khuẩn acid acetic. Kết quả định danh ở mức độ giống bằng phương pháp hình thái học và phân tích sinh hóa xác định có 3 giống nấm men: *Hanseniaspora*, *Saccharomyces* và *Brettanomyces*; 2 giống nấm mốc: *Rhizopus* và *Aspergillus*; 4 giống vi khuẩn acid lactic: *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactococcus* và *Lactobacillus*; 1 giống vi khuẩn acid acetic: *Acetobacter*.

## 1 GIỚI THIỆU

Cây ca cao có nguồn gốc từ các khu rừng nhiệt đới rậm rạp ở vùng Amazon (thuộc Nam Mỹ), tên khoa học là *Theobroma cacao*, thuộc họ Sterculiaceae. Việt Nam có nhiều tiềm năng phát triển ca cao do cây ca cao có ưu thế nổi trội là có thể trồng xen với nhiều loại cây như: dừa, điều, hồ tiêu, cà phê, chuối, đồng thời có khả năng chịu hạn, chống xói mòn đất rất cao nên rất thích hợp với điều kiện tự nhiên và thổ nhưỡng ở các tỉnh phía Nam và Tây Nguyên. Đến cuối năm 2006, diện tích trồng xen cây ca cao đạt hơn 7.300 hecta, chủ yếu tập trung ở các tỉnh: Bến Tre, Tiền Giang, Bà Rịa - Vũng Tàu, Đắc Lắc, Đắc Nông và Bình Phước (Nguyễn Văn Hoà, 2007). Hiện tại, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn Việt Nam đã xây dựng kế hoạch trồng ca cao lên đến 60.000 hecta vào năm 2015 và 80.000 hecta vào năm 2020.

Một số nghiên cứu trên thế giới đã xác định hệ vi sinh vật rất đa dạng tham gia vào quá trình lên men bao gồm nấm men (*Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*,...), vi khuẩn acid lactic (*Lactobacillus*, *Betabacterium*, *Streptobacterium*, *Streptococcus*,...), vi khuẩn acid acetic (*Acetobacter*, *A. ascendens*, *A. suboxydans*, *A. xylinodes*, *A. orleanense*, *Gluconobacter oxydans*,...), vi khuẩn *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. circulans*, *B. licheniformis*,...) và nấm mốc (*Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*,...). Mỗi nhóm vi sinh vật đều có một vai trò rất quan trọng ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình lên men cũng như chất lượng hạt thành phẩm. Do đó, các công trình nghiên cứu tuyển chọn và ứng dụng hệ vi sinh vật chức năng để điều khiển quá trình lên men cũng được quan tâm thực hiện ở nhiều nơi trên thế giới (Schwan, 1998; Ardhan và Fleet, 2003; Schwan và Wheals, 2004; Gálvez *et al.*, 2007; Lefeber *et al.*, 2010).

Ở Việt Nam, cho đến nay những tài liệu công bố kết quả nghiên cứu liên quan về hệ vi sinh vật trong quá trình lên men ca cao là rất hạn chế, mà chỉ có các thông tin tham khảo dựa trên nghiên cứu từ các nước khác. Nghiên cứu này nhằm xác định được hệ vi sinh vật hiện

diện trong quá trình lên men ca cao ở Việt Nam, bao gồm nấm mốc, nấm men và vi khuẩn. Qua đó có thể tạo được cơ sở để tiến hành nghiên cứu sự tác động của từng loại vi sinh vật đến quá trình lên men và đây cũng là cơ sở cho việc sử dụng các vi sinh vật này như là một nguồn giống thuần chủng để điều khiển quá trình lên men đạt chất lượng tốt.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Vật liệu và hóa chất

- Vật liệu: mẫu ca cao tại nông hộ Bến Tre.
- Hóa chất: dung dịch NaOH 0,1N; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%. Bộ thuốc nhuộm Gram (crystal violet, iod, acetone, ethanol, fuchsin) và các hóa chất dùng trong nghiên cứu: penicilline, oxytetracycline, peptone, phenol, agar, yeast extract, D-glucose, CaCO<sub>3</sub>, FeCl<sub>3</sub>, ethanol, glycerol, natamycine,...

### 2.2 Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1 Khảo sát sự thay đổi của hệ vi sinh vật trong quá trình lên men ca cao

Ca cao sau khi được thu hoạch, tách hạt và tiến hành ủ trong điều kiện tự nhiên. Lên men trong các thùng gỗ có đục lỗ ở đáy thùng. Khối lượng hạt tươi được đem ủ trong mỗi thùng là 50 kg. Trong quá trình ủ, tại các thời điểm 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 và 7 ngày, tiến hành thu mẫu (cùng lúc thu mẫu đo pH, nhiệt độ, ẩm độ và acid tổng số). Sau đó tiến hành nuôi cấy vi sinh vật trong mẫu thu được trên môi trường chuyên biệt. Thực hiện phương pháp đếm sống để xác định mật số, mô tả hình thái học và phân tích sinh hóa các loại vi sinh vật bao gồm: tổng số vi khuẩn hiếu khí, nấm men, nấm mốc, vi khuẩn acid lactic, vi khuẩn acid acetic và vi khuẩn *Bacillus*. Thí nghiệm được lặp lại ba lần.

#### 2.2.2 Phân lập vi sinh vật trong lên men ca cao

Sử dụng môi trường chuyên biệt để nuôi cấy nấm men, nấm mốc, vi khuẩn acid lactic và vi khuẩn acid acetic. Phân lập tạo giống thuần: Tùy theo cách phát triển của từng nhóm vi sinh vật trên môi trường chuyên biệt mà khuẩn lạc có hình dạng, dạng bìa, độ nổi, màu sắc, kích thước,... khác nhau; Chọn các khuẩn lạc rời và dùng phương pháp cấy chuyển nhiều lần trên

môi trường chuyên biệt cho đến khi các khuẩn lạc tách rời ra và đồng nhất về hình dạng và màu sắc; Nhìn bằng mắt thường có thể phân biệt được hai loại khuẩn lạc rất khác biệt nhau trên môi trường đặc hiệu là:

– Khuẩn lạc vi khuẩn và khuẩn lạc nấm men: do cấu tạo đơn bào nên chúng tạo ra khuẩn lạc có những đặc trưng như: hình dạng khuẩn lạc thường tròn, không đều hay hình thoi, bìa của khuẩn lạc là nguyên, gợn sóng, chia thùy hay răng cưa.

– Khuẩn lạc nấm mốc: do cấu tạo bởi nhiều sợi nấm nên khuẩn lạc có hình dạng rễ cây, bìa của khuẩn lạc là các sợi, nhìn kỹ sẽ thấy như sợi gòn thật mịn, màu trắng và khi sinh bào tử (có màu sắc khác) xuất phát từ giữa khuẩn lạc.

### 2.2.3 Định danh ở mức độ giống các dòng được phân lập trong lên men ca cao

Dựa trên các đặc điểm đặc trưng để định danh ở cấp độ giống.

– Nấm men: dựa trên các đặc điểm hình thái, kích thước tế bào nấm men; hình dạng, số lượng bào tử trong 1 túi bào tử; cách nảy chồi và các hình thức sinh sản,... (Lương Đức Phẩm, 2005).

– Nấm mốc: dựa trên các đặc điểm của sợi nấm: màu sắc, có vách ngăn hay không; các đặc điểm của cơ quan sinh sản: hình dạng, cách sắp xếp các bộ phận của cơ quan sinh sản và các đặc điểm về hình dạng, cấu tạo, cách sắp xếp của bào tử (Samson *et al.*, 2004).

– Vi khuẩn: dựa trên các đặc điểm về hình dạng tế bào, hình dạng khuẩn lạc, nhuộm Gram, thử nghiệm catalase, khả năng lên men đường, pH phát triển, hình dạng và vị trí nội bào tử, hiếu khí hay kỵ khí, môi trường phát triển,... (Madigan *et al.*, 2009).

## 2.3 Phương pháp phân tích

### 2.3.1 Phương pháp đếm mật số vi sinh vật

Dùng phương pháp đếm mật số trên môi trường chuyên biệt cho từng nhóm vi sinh vật, bao gồm: vi sinh vật tổng số: Plate Count Agar

(PCA); nấm men: Oxytetracycline D - Glucose Yeast Extract Agar (OGYEA); nấm mốc: Czapek-Dox Agar; vi khuẩn acid lactic: MRS Agar; vi khuẩn acid acetic: YPGD (D-glucose 5g/L, yeast extract 5g/L, glycerol 5g/L và polypeptone 5g/L và bổ sung ethanol 4% và CaCO<sub>3</sub> 0,5%) và vi khuẩn *Bacillus*: Nutrient Agar.

### 2.3.2 Các thử nghiệm xác định và phân loại vi khuẩn

*Đối với vi khuẩn acid lactic*: Đếm khuẩn lạc phát triển trên môi trường thạch MRS sau khi ủ vi hiếu khí ở 30°C trong 48 giờ. Sau đó, để khẳng định là vi khuẩn acid lactic bằng cách nhuộm Gram, thử nghiệm catalase và thử nghiệm khả năng lên men acid lactic bằng thuốc thử Ufermen. Tiêu chuẩn xác định là vi khuẩn acid lactic: Gram dương, trực khuẩn, cầu khuẩn hoặc cầu trực khuẩn; catalase âm tính; chuyển màu thuốc thử Ufermen.

*Đối với vi khuẩn acid acetic*: Đếm khuẩn lạc phát triển trên môi trường thạch YPGD sau khi ủ hiếu khí ở nhiệt độ 37°C trong 48 giờ. Sau đó, để khẳng định là vi khuẩn acid acetic tiến hành nhuộm Gram và thử nghiệm catalase. Tiêu chuẩn xác định là vi khuẩn acid acetic: Vi khuẩn acetic acid sử dụng ethanol tạo ra acid acetic, do đó CaCO<sub>3</sub> bị phá vỡ, xung quanh khuẩn lạc hình thành những vùng sáng trên môi trường YPGD (bổ sung 4% ethanol và 0,5% CaCO<sub>3</sub>), Gram âm và catalase dương tính.

*Đối với vi khuẩn Bacillus*: Đếm khuẩn lạc phát triển trên môi trường thạch Nutrient agar sau khi ủ hiếu khí ở nhiệt độ 37°C trong 48 giờ. Sau đó, để khẳng định là vi khuẩn *Bacillus* bằng cách nhuộm Gram và thử nghiệm catalase. Tiêu chuẩn xác định vi khuẩn *Bacillus* là các trực khuẩn Gram dương và catalase dương tính.

### 2.3.3 Phương pháp xử lý số liệu

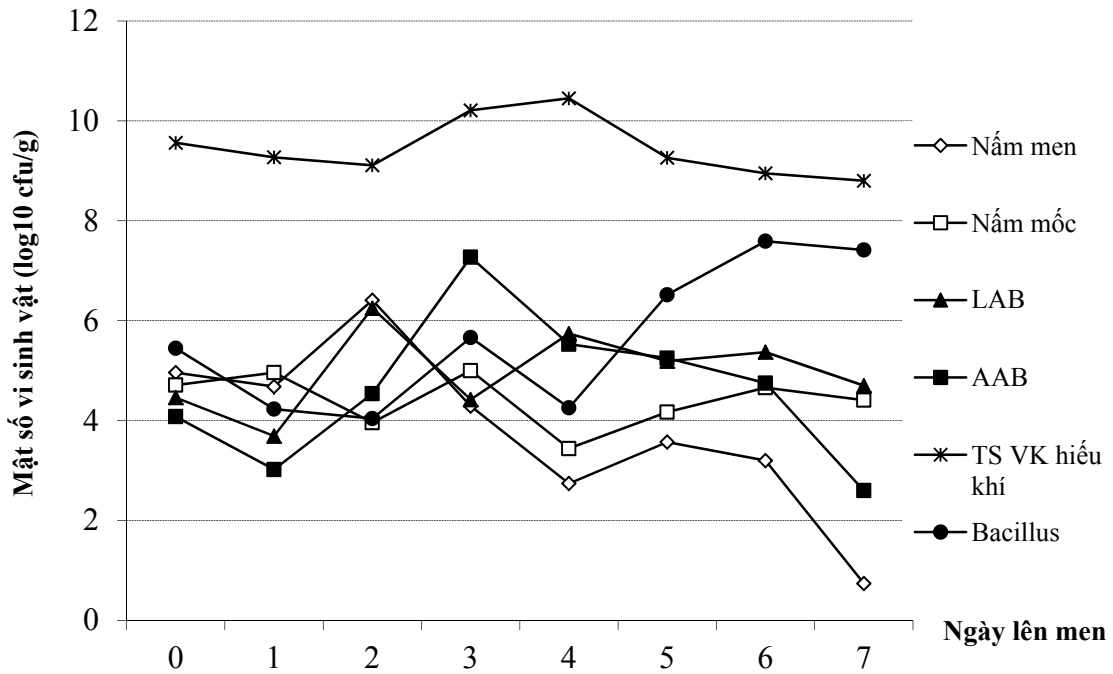
Kết quả nhận được là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Microsoft Excel. Các số được xử lý bằng chương trình StatGraphics Plus Version 3, Manugistics, Inc., Rockville, USA.

### 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1 Sự thay đổi mật số vi sinh vật trong quá trình lên men ca cao

Sự thay đổi mật số vi sinh vật bao gồm tổng

số vi khuẩn hiếu khí, nấm men, nấm mốc, vi khuẩn acid lactic, vi khuẩn acid acetic và vi khuẩn *Bacillus* được thể hiện ở Hình 1.



Hình 1: Sự thay đổi của mật số vi sinh vật trong lên men ca cao

Kết quả ở Hình 1 cho thấy mật số vi sinh vật luôn biến đổi trong suốt quá trình lên men. Thịt quả ca cao chứa nhiều đường và pH ban đầu thích hợp cho sự phát triển của nấm men, chúng có thể sử dụng carbohydrate từ cơm hạt trong điều kiện hiếu khí hoặc kỵ khí. Mật số nấm men đạt giá trị cao nhất ở ngày thứ 2 (6,4 log cfu/g) và có khác biệt ý nghĩa về mật thống kê mức 5% so với các ngày còn lại. So với kết quả trong lên men ca cao ở Indonesia của Ardhana và Fleet (2003), nấm men hiện diện với mật số cao nhất trong quá trình lên men ca cao là 7,0 - 8,0 log cfu/g trong suốt 24 - 36 giờ đầu lên men. Sau đó, mật số này giảm nhanh trong những ngày tiếp theo và đến ngày lên men thứ 4 mật số nấm men còn 2,7 log cfu/g. Sự giảm mật số nấm men trong quá trình lên men là do khi nấm men gia tăng mật số trong điều kiện hiếu khí ở giai đoạn đầu và trong điều kiện kỵ khí

chúng sinh ra rượu ức chế trở lại hoạt động của nấm men. Nhiệt độ khối lên men tăng cao đồng thời pH giảm và điều kiện khối ủ trở nên thông thoáng hơn do một số dòng tạo ra pectinolytic enzyme phá vỡ lớp kết dính vách tế bào cơm hạt. Nhu mô của khối tế bào bị xẹp xuống trong phần cơm hạt gần hạt, kết quả là hình thành những khoảng không do sự xâm nhập của không khí. Vì vậy, điều kiện trong khối ủ không còn thích hợp cho sự phát triển của nấm men. Tuy nhiên, mật số nấm men không thay đổi nhiều từ ngày thứ 4 đến thứ 6 nhưng có sự giảm rõ rệt vào ngày lên men thứ 7 là do điều kiện môi trường không thuận lợi.

Vi khuẩn acid lactic (LAB) hiện diện ngay khi bắt đầu lên men đến khi kết thúc quá trình lên men và khi điều kiện thích hợp, LAB gia tăng nhanh mật số. LAB đạt mật số cao nhất trong khoảng ngày thứ 2 khi bắt đầu lên men

(6,3 log cfu/g). Trong lên men cao ở Indonesia, LAB đạt cao nhất ở 8 - 9 log cfu/g trong 36 giờ đầu lên men (Ardhana và Fleet, 2003). Nhưng mật số này được chỉ giữ trong thời gian rất ngắn sau đó giảm xuống còn khoảng 4,0 log cfu/g vào ngày thứ 3 và tăng trở lại vào ngày thứ 4 khi mật số đạt trong khoảng 5,7 log cfu/g thì mật số này dao động nhẹ cho đến những ngày cuối quá trình lên men (4,7 log cfu/g). Nhìn chung, trong quá trình lên men, mật số LAB không có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê mức 5% giữa các ngày lên men.

Kết quả thể hiện ở Hình 1 cho thấy có sự liên tiếp nhau chiếm ưu thế của các vi sinh vật trong suốt quá trình lên men. Khi điều kiện khối ủ trở nên thoáng khí hơn, tạo điều kiện thích hợp cho sự phát triển của vi khuẩn acid acetic (AAB). Mật số AAB đạt cao nhất vào ngày thứ 3 (7,3 log cfu/g). Mật số AAB theo kết quả Vương Thanh Tùng (2005) cũng đạt cao nhất vào ngày thứ 3 (7,0 log cfu/g). Sau đó, mật số giảm còn khoảng 5,5 log cfu/g vào ngày thứ 4. Vi khuẩn acid acetic oxy hóa rượu thành acid acetic và có thể chuyển hóa tiếp acid acetic thành CO<sub>2</sub> và H<sub>2</sub>O. Phản ứng này tỏa nhiệt và đưa nhiệt độ khối ủ lên men lên cao. Mật số AAB giảm dần cho đến cuối quá trình lên men (2,6 log cfu/g).

Tổng số vi khuẩn hiếu khí ban đầu có khuynh hướng giảm mật số và gia tăng sau ngày thứ 2, đạt mật số cao nhất vào ngày thứ 4, đạt 10,5 log cfu/g và mật số lại giảm cho đến cuối quá trình lên men. Điều này được giải thích bởi Schwan và Wheals (2004) là do lúc đầu lượng thịt quả còn khá nhiều ngăn cản quá trình xâm nhập của oxy vào trong khối ủ nên các vi khuẩn hiếu khí khó phát triển. Sau đó nhờ sự phát triển của nấm men đã phân hủy lớp cơm hạt tạo điều kiện thoáng khí hơn thuận lợi cho sự phát triển của vi khuẩn hiếu khí. Vì vậy, vi khuẩn hiếu khí gia tăng mật số và đạt mật số cao rồi giảm dần theo đường cong sinh trưởng của vi sinh vật.

Mật số vi sinh vật có ích giảm dần vào hai ngày cuối giai đoạn lên men và điều kiện gia tăng sự thông thoáng khí, làm tăng giá trị pH và nhiệt độ tăng ở giai đoạn sau của quá trình lên

men được kết hợp với sự phát triển của vi khuẩn hiếu khí là *Bacillus*. Vi sinh vật này đạt mật số cao nhất vào ngày thứ 6 là 7,6 log cfu/g và sau đó mật số cũng giảm vào ngày thứ 7 còn 7,4 log cfu/g.

Điều kiện thông thoáng khí cũng thuận lợi cho sự phát triển của nấm mốc. Hai ngày đầu của quá trình lên men mật số nấm mốc giảm, sau đó gia tăng vào ngày thứ 3 (5,0 log cfu/g) và lại tiếp tục giảm khi nhiệt độ khối ủ quá cao và môi trường có pH quá thấp vào ngày thứ 4 (3,4 log cfu/g) và gia tăng trở lại vào cuối giai đoạn lên men (4,4 log cfu/g) khi điều kiện thuận lợi hơn.

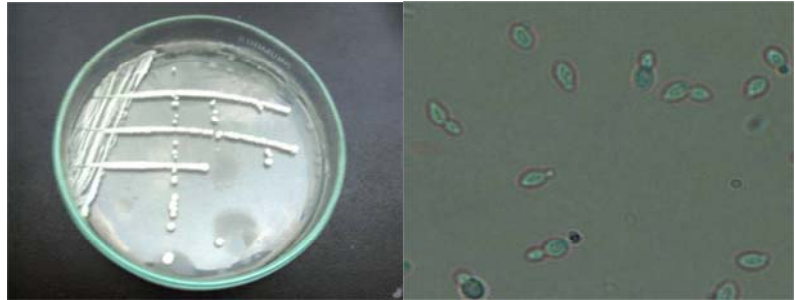
## 3.2 Phân lập và định danh vi sinh vật trong lên men cao

### 3.2.1 Kết quả phân lập và định danh nấm men

Các dòng nấm men được phân lập trên môi trường Oxytetracycline Yeast Extract Agar (OGYA). Sau khi phân lập tạo các giống thuần, tiến hành quan sát trên kính hiển vi các đặc điểm về hình thái tế bào, hình thức sinh sản kết hợp với quan sát hình thái khuẩn lạc của các giống nấm men này được nuôi cấy trên môi trường thạch trong đĩa petri để chọn được các giống nấm men khác nhau. Kết quả đã phân lập được 20 dòng phân lập thuần. Qua quan sát các đặc điểm về hình thái khuẩn lạc và tế bào đã phân loại và xếp các dòng phân lập rông vào các nhóm riêng, các dòng phân lập có đặc điểm giống nhau được xếp vào một nhóm; đại diện tiêu biểu các dòng phân lập ở từng nhóm được mô tả cụ thể về đặc điểm của khuẩn lạc và tế bào, trên cơ sở đó phân loại và định danh các dòng đại diện này theo Lương Đức Phẩm (2005). Kết quả đã chọn được 4 dòng phân lập khác nhau và được định danh thuộc 3 giống là *Hanseniaspora*, *Saccharomyces* và *Brettanomyces*.

Đặc điểm khuẩn lạc của CY-1: đường kính khoảng 0,3 - 0,35 cm, chiều dày 0,1 mm, bề mặt khuẩn lạc phẳng, trơn, bìa nguyên, màu trắng sữa. Tế bào nấm men hình ellip, có đầu nhọn, sinh sản bằng cách nảy chồi ở một đầu được xác định thuộc giống *Hanseniaspora* (Hình 2).

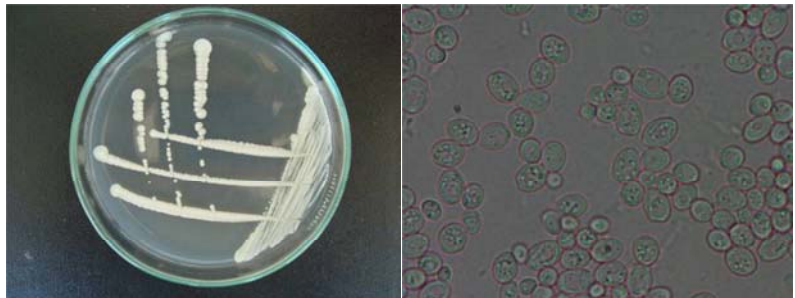
**Hình 2: Khuẩn lạc CY-1 và tế bào trên kính hiển vi ở X100**



Khuẩn lạc CY-2 có bề mặt trơn, lồi, bìa nguyên; màu trắng sữa, đường kính khoảng 0,3 - 0,4 cm, dày 0,1 mm; trên khuẩn lạc có những vòng đồng tâm. Tế bào hình ovan (hình trứng), sinh sản vô tính bằng cách nảy chồi, có chứa

bào tử trong nang được xác định thuộc giống *Saccharomyces* (Hình 3). Dòng CY-3 có các đặc điểm tương tự nhưng tế bào nấm men có dạng hình cầu và cũng được xác định thuộc giống *Saccharomyces*.

**Hình 3: Khuẩn lạc CY-2 và tế bào trên kính hiển vi ở X100**



Khuẩn lạc CY-4 có đường kính khoảng 0,2 - 0,3 cm, dày 0,1 mm, bề mặt khuẩn lạc trơn, phẳng, bìa nguyên, màu trắng sữa. Tế bào hình

ovan thót nhọn ở đầu và kéo dài ra, nảy chồi ở cả hai đầu được xác định thuộc giống *Brettanomyces* (Hình 4).

**Hình 4: Khuẩn lạc CY-4 và tế bào trên kính hiển vi ở X100**

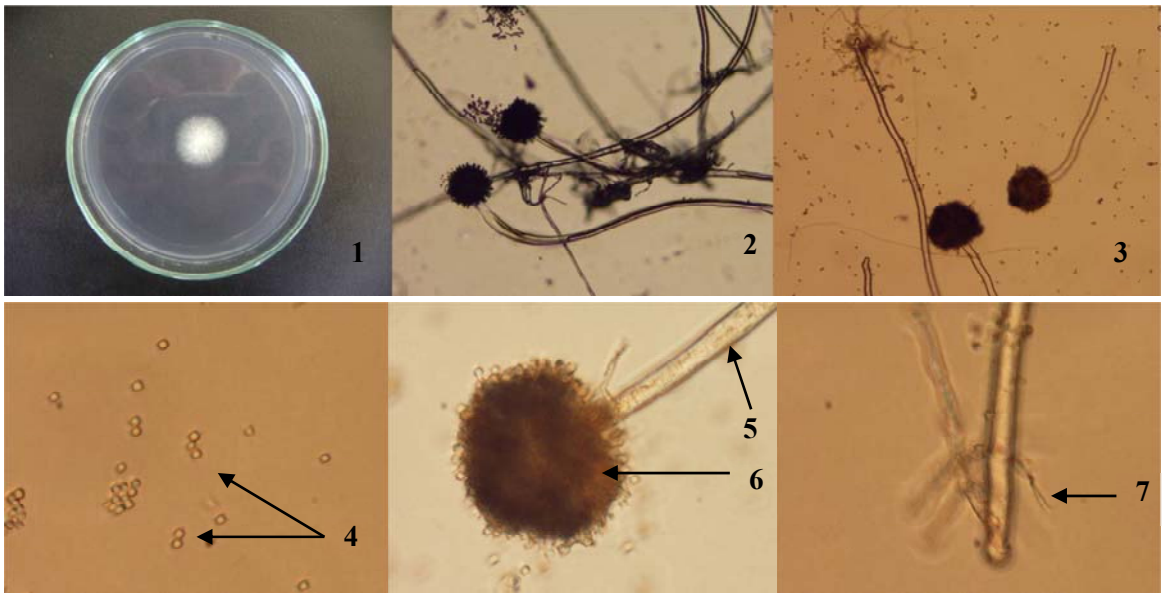


### 3.2.2 Kết quả phân lập và định danh nấm mốc

Kết quả đã phân lập được 13 dòng phân lập rỗng, các dòng phân lập có đặc điểm giống nhau được xếp thành một nhóm. Dựa vào các đặc điểm phân loại nấm mốc theo mô tả của Samson *et al.* (2004) đã chọn được 5 dòng phân lập có đặc điểm đặc trưng khác nhau và định danh thuộc 2 giống là *Rhizopus* và *Aspergillus*.

Dòng phân lập CF-1 được xác định là giống *Rhizopus* và các đặc điểm đặc trưng được mô tả

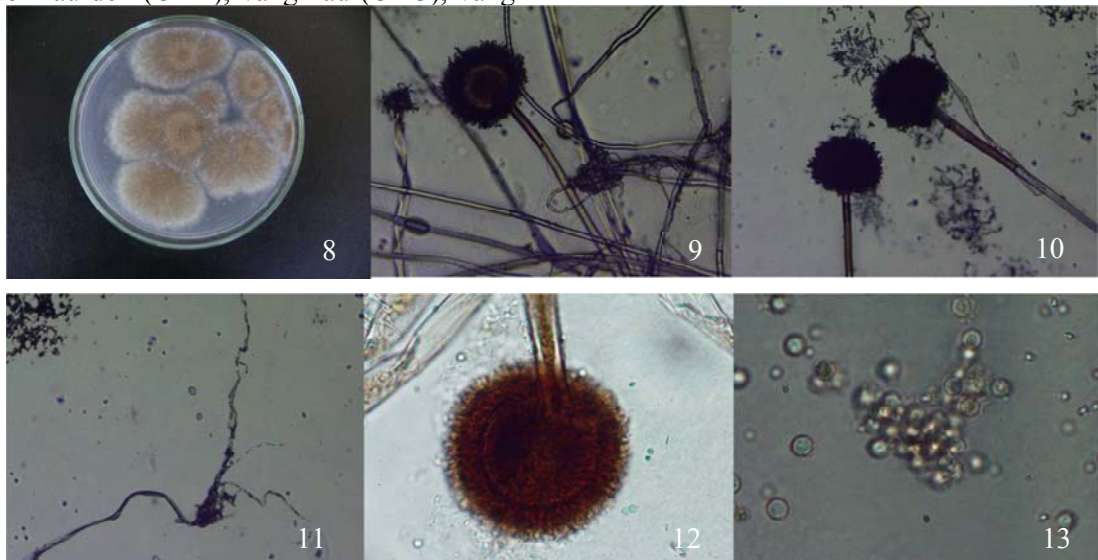
chi tiết ở Hình 5. Khuẩn lạc có đường kính khoảng 2,5 cm sau 24 giờ nuôi cấy, bề mặt nhum ướt, mép khuẩn lạc mỏng, bìa rễ cây; mặt trên khuẩn lạc có màu đen (màu của bào tử) mặt dưới của khuẩn lạc có màu trắng (màu của khuẩn ty). Khuẩn ty có màu trắng, không có vách ngăn ngang, khuẩn ty phát triển thành khuẩn căn và khuẩn ngang. Sinh sản vô tính với bào tử trong bọc, cộng bào tử phát triển từ khuẩn ty mọc thẳng lên không và mang túi bào tử, bào tử có màu đen.



**Hình 5: Khuẩn lạc CF-1 (1), sợi nấm (2, 3) bào tử (4) trên kính hiển vi X40, cộng mang bào tử (5), túi bào tử (6) và khuẩn căn (7) trên kính hiển vi ở X100**

Các dòng CF-2, CF-3, CF-4 và CF-5 có các đặc điểm đặc trưng thuộc giống *Aspergillus* với đặc điểm chính của khuẩn lạc: đường kính khoảng 2,5 - 3,5 cm có bề mặt nhợt nhạt, mép khuẩn lạc mỏng, bìa rễ cây; mặt trên khuẩn lạc có màu đen (CF-2), vàng nâu (CF-3), vàng

(CF4) và trắng (CF-5). Khuẩn ty phân nhánh và có vách ngăn ngang. Cộng bào tử phát triển từ khuẩn ty và mang bào tử đính, bào tử có màu tương ứng như mô tả khuẩn lạc. Hình 6 thể hiện các hình ảnh đặc trưng của dòng CF-2.



**Hình 6: Khuẩn lạc CF-2 (8) và sợi nấm (9), cộng mang bào tử (10), khuẩn căn (11), trên kính hiển vi ở X10 và thể bình (12), bào tử (13) ở X40**

### 3.2.3 Kết quả phân lập và định danh vi khuẩn acid lactic

Các dòng vi khuẩn acid lactic được phân lập trên môi trường MRS Agar có bổ sung natamycine 2% (kháng nấm). Kết quả phân lập được 12 dòng thuần có các đặc tính đặc trưng của vi khuẩn acid lactic (Gram dương, catalase

âm tính, chuyển màu thuốc thử Ufermen). Kết hợp quan sát về hình thái tế bào và khuẩn lạc để chọn được các dòng vi khuẩn acid lactic khác nhau, kết quả đã phân lập và định danh 6 dòng phân lập khác nhau thuộc các giống *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* và *Streptococcus* (Bảng 1).

**Bảng 1: Đặc điểm các giống vi khuẩn acid lactic phân lập**

TT	Tên mẫu	Đặc điểm tế bào	Mô tả khuẩn lạc	Phân loại
1	CLAB-1	Tế bào vi khuẩn hình cầu; 2, 3 tế bào liên kết với nhau tạo thành chuỗi ngắn	Đường kính từ 0,2 - 0,3 cm; chiều dày 0,1 - 0,2 mm; giữa khuẩn lạc lồi lên; bề mặt khuẩn lạc trơn, bìa nguyên; khuẩn lạc có màu trắng đục	Lớp: Bacilli Bộ: Lactobacillales Họ: Leuconostocaceae Giống: <i>Leuconostoc</i>
2	CLAB-2	Tế bào vi khuẩn hình cầu liên kết với nhau thành sợi rất dài	Đường kính từ 0,1 - 0,2 cm; chiều dày 0,1 mm; giữa khuẩn lạc lồi lên; bìa nguyên; bề mặt khuẩn lạc trơn, khuẩn lạc có màu trắng đục	Lớp: Bacilli Bộ: Lactobacillales Họ: Streptococcaceae Giống: <i>Streptococcus</i>
3	CLAB-3	Tế bào vi khuẩn hình cầu; 2, 3 tế bào liên kết với nhau, hình chữ V, bám vào nhau thành từng cụm	Đường kính từ 0,15 - 0,2 cm; chiều dày 0,1 mm; giữa khuẩn lạc lồi lên; răng cưa; bề mặt khuẩn lạc xù xì, khuẩn lạc có màu trắng đục	Lớp: Bacilli Bộ: Lactobacillales Họ: Leuconostocaceae Giống: <i>Leuconostoc</i>
4	CLAB-4	Tế bào vi khuẩn hình cầu, thường liên kết hai tế bào với nhau, tồn tại dạng riêng rẽ, tế bào di chuyển	Đường kính từ 0,1 - 0,2 cm; chiều dày 0,1 - 0,2 mm; giữa khuẩn lạc lồi lên; bìa nguyên; bề mặt khuẩn lạc trơn, khuẩn lạc có màu trắng đục	Lớp: Bacilli Bộ: Lactobacillales Họ: Streptococcaceae Giống: <i>Streptococcus</i>
5	CLAB-5	Tế bào hình que, tồn tại dạng riêng rẽ	Đường kính từ 0,15 - 0,2 cm; chiều dày 0,15 mm; giữa khuẩn lạc lồi lên; bìa chia thùy; bề mặt khuẩn lạc trơn, khuẩn lạc có màu trắng đục	Lớp: Bacilli; Bộ: Lactobacillales Họ: Lactobacillaceae Giống: <i>Lactobacillus</i>
6	CLAB-6	Tế bào hình que ngắn, tồn tại dạng riêng rẽ	Đường kính từ 0,2 - 0,25 cm; chiều dày 0,1 mm; giữa khuẩn lạc lồi lên; bìa răng cưa; bề mặt khuẩn lạc xù xì, khuẩn lạc có màu trắng đục	Lớp: Bacilli; Bộ: Lactobacillales Họ: Lactobacillaceae Giống: <i>Lactobacillus</i>

### 3.2.4 Kết quả phân lập và định danh vi khuẩn acid acetic

Các dòng vi khuẩn acid acetic được phân lập trên môi trường YPGD có bổ sung CaCO<sub>3</sub> và cycloheximide (150 mg/L) để kháng nấm. Khuẩn lạc vi khuẩn acid acetic sẽ tạo vòng sáng do vi khuẩn sinh ra acid acetic hòa tan CaCO<sub>3</sub> làm mất màu trắng đục của môi trường. Kết quả

phân lập được 14 dòng vi khuẩn thuần cho kết quả phù hợp với đặc tính của vi khuẩn acid acetic (Gram âm, catalase dương tính). Quan sát về các đặc điểm hình thái tế bào và khuẩn lạc dựa trên tài liệu phân loại vi khuẩn của Madigan *et al.* (2009) đã chọn được 5 dòng phân lập khác nhau và định danh thuộc giống *Acetobacter* (Bảng 2).



**Bảng 2: Đặc điểm tế bào và khuẩn lạc các giống vi khuẩn acid acetic phân lập**

TT	Tên mẫu	Đặc điểm tế bào	Mô tả khuẩn lạc	Phân loại
1	CAAB-1	Tế bào vi khuẩn hình cầu; 2, 3 tế bào liên kết với nhau tạo thành chuỗi ngắn	Đường kính từ 0,2 - 0,25 cm; chiều dày 0,1 - 0,2 mm; giữa khuẩn lạc lõm xuống; bề mặt khuẩn lạc trơn, bìa nguyên; khuẩn lạc có màu vàng	Giới: Vi khuẩn Ngành: Proteobacteria Lớp: Alpha Proteobacteria Bộ: Rhodospirillales Họ: Acetobacteraceae Giống: <i>Acetobacter</i>
2	CAAB-2	Tế bào vi khuẩn hình cầu, thường 2,3 tế bào liên kết với nhau	Đường kính từ 0,15 - 0,2 cm; chiều dày 0,1 mm; giữa khuẩn lạc lõm xuống; bìa răng cưa; bề mặt khuẩn lạc trơn, khuẩn lạc có màu vàng	
3	CAAB-3	Tế bào vi khuẩn hình que; 2, 3 tế bào liên kết với nhau tạo thành que dài	Đường kính từ 0,15 - 0,2 cm; chiều dày 0,1 mm; giữa khuẩn lạc lõm lên; bìa răng cưa; bề mặt khuẩn lạc ướt và xù xì, khuẩn lạc có màu trắng đục	
4	CAAB-4	Tế bào vi khuẩn hình que, thường liên kết hai tế bào với nhau thành que dài cong, tồn tại dạng riêng rẽ	Đường kính từ 0,1 - 0,2 cm; chiều dày 0,1 - 0,2 mm; giữa khuẩn lạc lõm lên; bìa nguyên; bề mặt khuẩn lạc trơn, khuẩn lạc có màu trắng đục	

## 4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

### 4.1 Kết luận

Trong lên men ca cao, có sự hiện diện của nhiều nhóm vi sinh vật khác nhau và chiếm ưu thế ở từng giai đoạn của quá trình lên men với mật số cao nhất lần lượt là: nấm men (6,4 log cfu/g), vi khuẩn acid lactic (6,3 log cfu/g), vi khuẩn acid acetic (7,3 log cfu/g), vi khuẩn *Bacillus* (7,40 log cfu/g) và nấm mốc (4,41 log cfu/g). Tổng số vi khuẩn hiếu khí có giá trị cao nhất vào ngày thứ 4, đạt 10,45 log cfu/g.

Phân lập được 20 dòng nấm men, định danh sơ bộ thuộc 3 giống *Hanseniaspora*, *Saccharomyces* và *Brettanomyces*. Mười ba dòng nấm mốc chỉ thuộc 2 giống là *Rhizopus* và *Aspergillus*. Đa dạng hơn, 12 dòng vi khuẩn acid lactic thuộc 4 giống (*Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactococcus* và *Lactobacillus*). *Acetobacter* là giống vi khuẩn được xác định cho cả 14 dòng vi khuẩn acid acetic phân lập.

### 4.2 Đề xuất

– Định danh ở cấp độ loài các giống vi sinh vật đã phân lập được.

– Phân lập và tuyển chọn các dòng vi sinh vật có ích trong lên men ca cao từ nhiều địa phương khác nhau để đa dạng hóa nguồn vi sinh vật.

– Nghiên cứu sự tác động của các vi sinh vật đến quá trình lên men và chất lượng hạt ca cao lên men.

### LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí của Trường Đại học Cần Thơ thông qua đề tài cấp cơ sở T2012-44. Chân thành cảm ơn sự hợp tác của nông hộ Nguyễn Thị Hồng Lắm (Châu Thành, Bến Tre) và sinh viên Đặng Thị Hồng Nhung (lớp Công nghệ Sinh học Khóa 32, Viện NC&PT Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ).

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ardhana M. and G. H. Fleet, 2003. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology* 86: 87-99.
2. Gálvez, Sandra Lagunes, Gérard Loiseau, Jose Luis Paredes, Michel Barel, Joseph-Pierre Guiraud, 2007. Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. *International Journal of Food Microbiology* 114: 124-130.
3. Lefeber, Timothy, Maarten Janssens, Nicholas Camu, and Luc De Vuyst, 2010. Kinetic analysis of strains of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa pulp simulation media toward development of a starter culture for cocoa bean fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 76 (23): 7708-7716.

4. Lương Đức Phẩm, 2005. Nấm men Công nghiệp, NXB Khoa học và Kỹ thuật. 331 trang.
5. Madigan, T. Michael, John M. Martinko, Paul V. Dunlap, and David P. Clark, 2009. Brock Biology of Microorganisms, 12<sup>th</sup> edition. Pearson Education Inc., Illinois, USA. 1061 pp.
6. Nguyễn Văn Hoà, 2007. Tổng quan hiện trạng và định hướng phát triển ca cao đến năm 2010 ở Việt Nam. Chuyên đề: Phát triển cây ca cao bền vững ở Việt nam, Diễn đàn Khuyến nông @ Công nghệ lần thứ 6.
7. Samson, A. Robert, Ellen S. Hoekstra, Jens C. Frisvad, 2004. Introduction to Food- and Airborne Fungi, 7th edition. ASM Press, 389 pp.
8. Schwan, F. Rosane, 1998. Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. Applied and Environmental Microbiology 64 (4): 1477-1483.
9. Schwan, F. Rosane and Alan E. Wheals, 2004. The Microbiology of Cocoa Fermentation and its Role in Chocolate Quality. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 44: 205-211.
10. Vương Thanh Tùng, 2005. Khảo sát ảnh hưởng của quá trình ủ lên men đến chất lượng hạt ca cao. Luận văn Thạc sĩ ngành Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ. Thành phố Cần Thơ.