

TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG VI KHUẨN TIỀM NĂNG CHO LÊN MEN SINH AXÍT LACTIC

VŨ XUÂN NAM, ĐỖ TẤT THỊNH

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay vi khuẩn lactic - Lactic acid Bacteria (LAB) đã được chứng minh có thể tạo ra nhiều lợi ích trong phòng ngừa, điều trị bệnh cũng như phục hồi và duy trì sức khỏe cho con người và vật nuôi như: Ngăn ngừa các bệnh nhiễm trùng [6, 7, 10], giảm cholesterol [9], giảm nhiễm trùng đường hô hấp và dị ứng [10], chống ung thư [8]. Trong những năm gần đây, khi ý thức về vấn đề môi trường đã được nâng cao, phát triển hướng nghiên cứu chế tạo vật liệu có khả năng tự phân huỷ trong môi trường tự nhiên sau khi hết niên hạn sử dụng, trong số đó phải kể đến polylactic axit (PLA). Đây là một loại polyeste mạch thẳng, thuộc nhựa nhiệt dẻo, sản phẩm của quá trình trùng ngưng axit lactic, một loại nguyên liệu được điều chế từ tinh bột (sắn, ngô,...), ri đường bằng phương pháp lên men hoặc tổng hợp qua quá trình đường hóa. PLA được xem là sự lựa chọn thích hợp để thay thế chất dẻo có nguồn gốc từ dầu mỏ vì có khả năng phân hủy sinh học và độc tính thấp [5]. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm phân lập và lựa chọn các chủng vi khuẩn đại từ các nguồn thực phẩm lên men, thực vật, đất... ở các địa phương khác nhau có khả năng sinh axit lactic tốt, tối ưu điều kiện lên men và sử dụng các chủng này làm nguồn cho các nghiên cứu sản xuất ứng dụng các sản phẩm từ axit lactic.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vi sinh vật

Các chủng LAB được phân lập từ các mẫu thực phẩm lên men, thực vật, đất... thu thập tại các địa phương.

2.2. Môi trường

Môi trường nghiên cứu cơ bản: MRS (g/l) pepton - 10; cao thịt bò - 10; cao nấm men - 5; CH_3COONa - 5; K_2HPO_4 - 2; triamonium citrate - 2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,02; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,05; Tween 80 - 1ml; agar 15.

2.3. Phương pháp

Sử dụng các phương pháp nghiên cứu vi sinh thông dụng trong việc phân lập và xác định các đặc điểm sinh học của LAB.

Xác định dạng chuyển hóa đường glucose của các chủng LAB phân lập được. Lựa chọn các chủng chuyển hóa đồng hình bằng phương pháp lên men trong ống nghiệm chứa ống Durham (nếu xuất hiện khí là dạng lên men dị hình còn kết luận là dạng đồng hình khi không có khí trong ống Durham). Tiến hành lên men từ các chủng lên men đồng hình và xác định lượng axit lactic sinh ra.

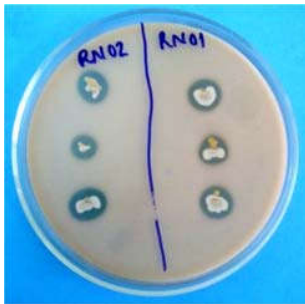
Định lượng khả năng sinh axit lactic của các chủng LAB được xác định bằng phương pháp chuẩn độ Therner bằng NaOH.

Lựa chọn các chủng có khả năng sinh axit lactic, tiến hành lên men và lựa chọn các điều kiện thích hợp để tăng hiệu suất của các chủng vi khuẩn (tiến hành lên men trong bình tam giác 100 ml; pH môi trường 6,5; sử dụng nguồn đường glucose).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập vi khuẩn lactic

Từ các nguồn thực phẩm lên men, thực vật, rau củ quả, đất... đã thu được 47 mẫu và tiến hành phân lập trên môi trường MRS. Kết quả đã phân lập được 77 chủng vi khuẩn qua xác định đặc điểm sinh lý sinh hóa và đặc điểm hình thái (Gram dương, kỵ khí tùy tiện, không sinh bào tử, khuẩn lạc tròn nhỏ, tế bào hình cầu hoặc hình que, catalase âm tính, oxydase âm tính) có 49 chủng là LAB (bảng 1).



Hình 1. Vòng phân giải CaCO₃



Hình 2. Bảo quản trong MRS với 40% glycerin



Hình 3. Vi khuẩn lactic cấy trong ống thạch (vi khuẩn kỵ khí tùy tiện)

Bảng 1. Danh sách các nguồn mẫu đã phân lập được các chủng LAB

STT	Nguồn	Số lượng mẫu	Số lượng chủng LAB phân lập được
1	Dưa muối, cà muối, sung muối, măng chua	24	31
2	Nem chua, thịt chua, tôm chua, phomat	8	9
3	Gạo, rau, củ, quả và thực vật	12	5
4	Đất, phân chuồng	3	4

Dữ liệu trong bảng 1 cho thấy nguồn các thực phẩm lên men truyền thống như dưa chua, cà muối... chứa chủ yếu các chủng LAB, còn trên rau và một số loại thực vật thì có rất ít.

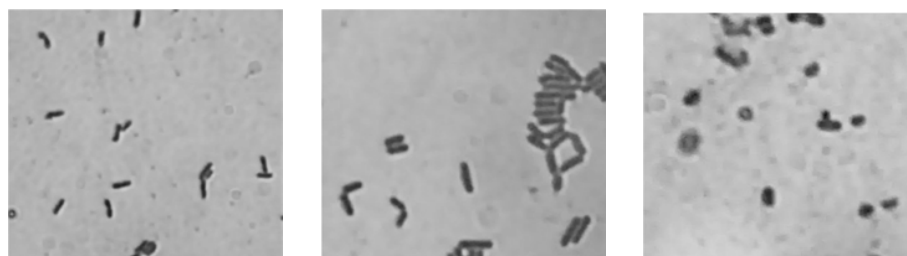
3.2. Định lượng axit lactic sinh ra từ các chủng tuyển chọn

Các chủng LAB sau khi được làm sạch, tiến hành lựa chọn các chủng vi khuẩn lên men chuyển hóa đường dạng đồng hình. Trong 49 chủng LAB có 28 chủng lên men lactic đồng hình. Các chủng vi khuẩn đồng hình được lên men trong môi trường MRS lỏng, xác định lượng axit lactic sinh ra bằng phương pháp xác định độ Therner. Trong 28 chủng LAB đồng hình có 8 chủng sinh axit lactic từ 20 ÷ 29 g/l, 8 chủng sinh axit lactic trong khoảng 18 ÷ 20 g/l và 12 chủng còn lại sinh axit lactic trong khoảng 8 ÷ 17 g/l. Từ những chủng đã phân lập lựa chọn được 3 chủng có khả năng sinh axit cao nhất để đưa vào thử nghiệm lựa chọn điều kiện thích hợp cho quá lên men là MC05, PM02 và TC06 (bảng 2).

Bảng 2. Đặc điểm và khả năng sinh tổng hợp axit lactic của chủng TC06, PM02 và MC05

STT	Ký hiệu	Nguồn phân lập	Đặc điểm khuẩn lạc	Hàm lượng axit lactic (g/l)
1	TC06	Tôm chua Huế	Tròn, nhỏ, trong	22.86
2	PM02	Phomat	Tròn, trắng sữa	29.16
3	MC05	Măng chua Thanh Hóa	Tròn, nhỏ, trắng đục	23.4

Những chủng được phân lập có khả năng sinh axit lactic cao hơn so với tác giả Đào Thị Lương và cộng sự chỉ đạt 8 ÷ 21 g/l sau 48 giờ lên men trong môi trường MRS [1].

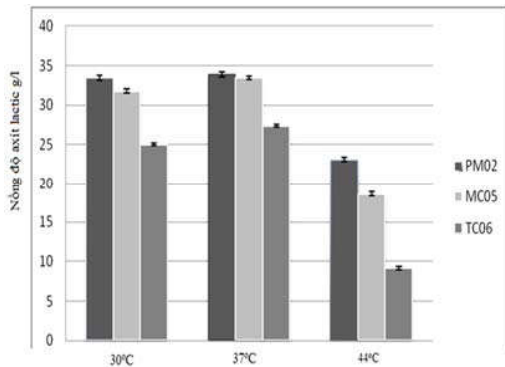


Hình 4. Tế bào vi khuẩn chủng PM02, MC05 và TC06

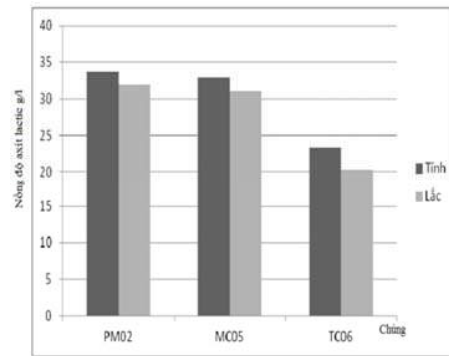
3.3. Xác định điều kiện thích hợp sinh axit lactic

Ảnh hưởng của nhiệt độ

Ở nhiệt độ 30°C lượng axit sinh ra bởi các chủng PM02 là 33,45 g/l, MC05 là 31,8 g/l và TC06 là 25,05 g/l; ở nhiệt độ 37°C các chủng PM02, MC05 và TC06 cho hàm lượng axit sinh ra lần lượt là 33,9; 33,45 và 27,4 g/l. Ở nhiệt độ 44°C thì lượng axit sinh ra lại thấp hơn rất nhiều so với ở nhiệt độ 37°C chỉ đạt ở các chủng PM02, MC05 và TC06 lần lượt là 23,1; 18,6 và 9,15 g/l. Hai chủng PM02 và MC05 có khả năng sinh trưởng ở nhiệt độ 44°C, còn chủng TC06 phát triển kém ở nhiệt độ này. Như vậy, nhiệt độ 37°C là nhiệt độ thích hợp cho sự lên men sinh axit lactic của 3 chủng đã lựa chọn.



Hình 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh axit lactic

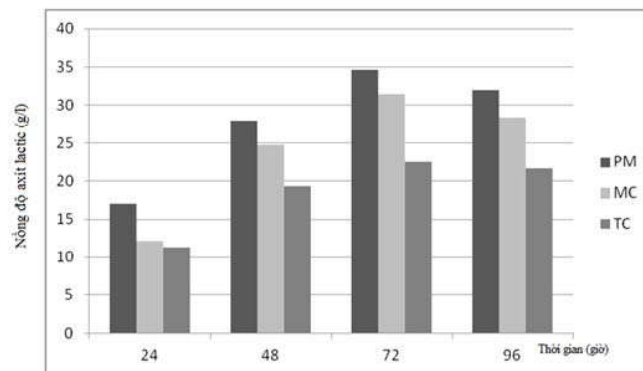


Hình 6. Ảnh hưởng của oxy đến khả năng sinh axit lactic

Khả năng sinh axit lactic theo nhu cầu oxy

Theo đồ thị hình 6 nhận thấy: Với quy mô lên men nhỏ, điều kiện tĩnh ở 37°C cho lượng axit sinh ra lớn hơn so với điều kiện lắc. Theo Kotzamanidis và cộng sự, lượng đường tối đa được chuyển hóa thành axit lactic vào khoảng 97% trên cả hai điều kiện tĩnh và lắc, tuy nhiên đối với hệ thống lắc thì tốc độ chuyển hóa cao hơn [11]. Do LAB là vi khuẩn kỵ khí tùy tiện, sự phát triển của chúng chủ yếu ở dưới đáy của hệ thống lên men, nếu ở hệ thống lên men lớn thì với mô hình lắc lượng đường trong dịch lên men sẽ được vi khuẩn sử dụng nhanh hơn. Còn đối với điều kiện lên men nhỏ thì ở điều kiện tĩnh phù hợp cho vi khuẩn phát triển mạnh nên lượng axit sinh ra sẽ lớn hơn so với điều kiện lắc.

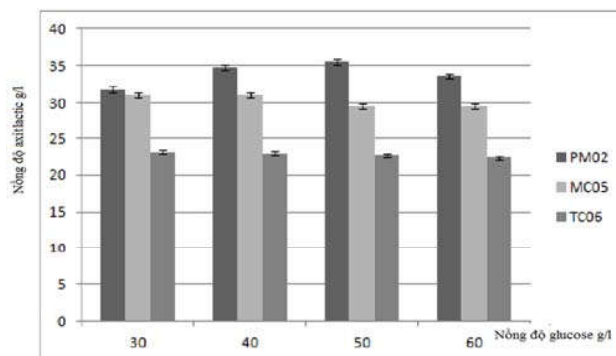
Khảo sát thời gian lên men axit lactic



Hình 7. Sự biến đổi của hàm lượng axit lactic theo thời gian

Đồ thị hình 7 cho thấy, sau 24 giờ lượng axit sinh ra tăng dần và đạt cao nhất sau 72 giờ lên men, sau đó giảm dần. Kết quả trên tương đồng ở cả 3 chủng PM02, MC05 và TC06. Kết quả này cũng phù hợp với Mai Đàm Linh và cộng sự đã kết luận lượng axit sinh ra cực đại trong vòng 48 ÷ 72 giờ và giảm dần sau 72 giờ [2]. Đối với nghiên cứu của Nguyễn Thế Trang và Trần Đình Mẫn, đã tiến hành thu hồi axit lactic ở thời gian 48 ÷ 60 giờ [4].

Khảo sát ảnh hưởng nồng độ đường thích hợp cho quá trình lên men

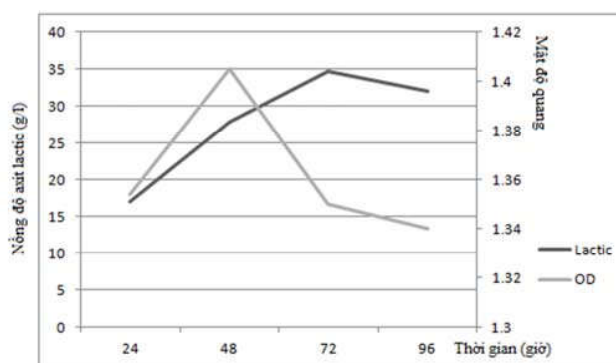


Hình 8. Ảnh hưởng của nồng độ đường glucose đến khả năng sinh axit lactic

Trong điều kiện lên men tĩnh ở thể tích 30 ml, các dãy nồng độ đường glucose lần lượt được sử dụng là 30, 40, 50 và 60 g/l. Qua biểu đồ hình 8 cho thấy, ở nồng độ đường 50 g/l thì lượng axit sinh ra bởi PM02 là cao nhất. Tuy nhiên ở nồng độ 40 g/l các chủng MC05 và TC06 đều cho lượng axit sinh ra cao hơn ở các nồng độ khác. Xét về khả năng chuyển hóa đường thành axit lactic, kết quả cao nhất là 87% ở chủng PM02 với nồng độ đường 40 g/l, và cũng ở nồng độ đường này khả năng chuyển hóa của hai chủng MC05 và TC06 cũng cao hơn hai nồng độ đường 50 và 60 g/l. Đối với nồng độ đường 30 g/l ở hai chủng PM02 và MC05 đều cho lượng axit sinh ra lớn hơn 30 g/l. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của tác giả Nguyễn Thị Diễm Hương với nồng độ axit lactic sinh ra trong môi trường lên men được xác định bằng HPLC của chủng DC1 là 20,93 g/l (>20 g/l glucose trong môi trường) [3].

Sự tương quan giữa mật độ tế bào và lượng axit lactic trong dịch lên men

Đồ thị hình 9 là tương quan giữa hàm lượng axit lactic sinh ra và mật độ quang của chủng PM02 được đo tại bước sóng 610 nm. Mật độ quang thể hiện mật độ tế bào phát triển cao nhất vào thời điểm 48 giờ, tuy nhiên lượng axit được xác định cao nhất vào thời điểm 72 giờ sau khi mật độ tế bào bắt đầu giảm. Do nghiên cứu này chưa khảo sát được khung thời gian ngắn hơn, nên chưa đưa được thời điểm cụ thể trong vòng 48 ÷ 72 giờ mật độ tế bào và lượng axit sinh ra cùng đạt ngưỡng.



Hình 9. Tương quan giữa axit lactic sinh ra và mật độ quang học (OD) theo thời gian

4. KẾT LUẬN

Đã lựa chọn được 3 chủng lên men đồng hình có tiềm năng cho lượng axit lactic sinh ra cao tại nhiệt độ 30°C, nồng độ đường 40 g/l, điều kiện tĩnh và thời gian thu hồi 72 giờ, trong đó chủng cho nồng độ axit lactic sinh ra cao nhất là 33,9 g/l, hiệu suất chuyển hóa đường lên đến 87%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đào Thị Lương, Nguyễn Thị Anh Đào, Nguyễn Thị Kim Quy, Trần Thị Lệ Quyên, Dương Văn Hợp, Trần Quốc Việt, Ninh Thị Len, Bùi Thị Thu Huyền, *Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn lactic dùng trong chế biến và bảo quản thức ăn thô xanh và phụ phẩm nông nghiệp cho gia súc nhai lại*, Tạp chí Di truyền học và ứng dụng - Chuyên san Công nghệ Sinh học, 2010, số 6.
2. Mai Đàm Linh, Đỗ Minh Phương, Phạm Thị Tuyết, Kiều Hữu Ảnh, Nguyễn Thị Giang, *Đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn lactic phân lập trên địa bàn thành phố Hà Nội*, Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, 2008, **24**:221-226.
3. Nguyễn Thị Diễm Hương, Đỗ Thị Bích Thủy, *Xác định và khảo sát một số tính chất có lợi của Lactobacillus fermentum DC1 phân lập từ sản phẩm dưa cải chua Huế*, Tạp chí Khoa học Đại học Huế, 2012, tập 2, số 71.
4. Nguyễn Thế Trang, Trần Đình Mẫn, *Một số đặc điểm phân loại của hai chủng vi khuẩn lactic HN11 và HN34 sinh tổng hợp L(+)-Lactic axit phân lập tại Việt Nam*, Tạp chí Công nghệ sinh học, 2008, **6**(4):505-511.
5. Phương Thanh Vũ, Trần Công Huyện, Đặng Thị Cẩm Tiên, Phạm Ngọc Trúc Quỳnh, *Nhựa phân hủy sinh học poly (lactic acid) tổng quan và ứng dụng*, Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, 2015, số 43.
6. Arunachalam K., Gill H. S. and Chandra R. K., *Enhancement of natural immune function by dietary consumption of Bifidobacterium lactis (HN019)*, European Journal of Clinical Nutrition, 2000, **54**(3):263-267.
7. Allen, Stephen J., et al., *Probiotics for treating acute infectious diarrhoea*, Cochrane Database Syst Rev., 2010, №11, **Vol.11**.
8. Bültzingslöwen I. et al., *Oral and intestinal microflora in 5-fluorouracil treated rats, translocation to cervical and mesenteric lymph nodes and effects of probiotic bacteria*, Oral microbiology and immunology, 2003, **18**(5):278-284.
9. Fuller, Roy, et al. *Probiotics 2: applications and practical aspects*, Springer Science & Business Media, 1997, **Vol. 2**.

10. Hatakka, Katja, et al., *Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial*, 2001, **322**(7298):1327.
11. Kotzamanidis, C. H., Roukas T., and Skaracis G., *Optimization of lactic acid production from beet molasses by Lactobacillus delbrueckii NCIMB 8130*, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2002, **18**(5):441-448.

SUMMARY

SELECTION OF POTENTIAL BACTERIAL STRAINS FOR LACTIC ACID FERMENTATION

Lactic acid bacteria is used in many areas. In this study, 49 strains of lactic acid bacteria were isolated from the vegetable, fruit, and fermented food. Among them 3 potential homo-fermentative strains were selected and one strains can produce lactic acid with the concentration of 33.9 g/l in the MRS medium containing 40 g/l glucose with the yield of 87% at 37°C.

Từ khóa: LAB, latic acid, PLA.

Nhận bài ngày 23 tháng 5 năm 2016

Hoàn thiện ngày 26 tháng 7 năm 2016

Phân viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga