

XÁC ĐỊNH MỘT SỐ TÍNH CHẤT CÓ LỢI CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN LACTIC PHÂN LẬP ĐƯỢC TỪ MẮM RUỐC HUẾ

Đỗ Thị Bích Thủy*, Nguyễn Thị Diễm Hương, Đinh Thị Thu Thanh

* Tác giả liên hệ:

Đỗ Thị Bích Thủy

Email:

dothibichthuy@huaf.edu.vn

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

Nhận bài: 05/03/2019

Chấp nhận bài: 02/05/2019

Từ khóa: *Lactobacillus fermentum*, Khả năng chịu muối, Probiotic, Mắm ruốc Huế, Vi khuẩn lactic

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm xác định khả năng chịu muối của mười chủng vi khuẩn lactic được ký hiệu lần lượt là (R1, R2, R5, R6, R8, R11, R12, R14, R15 và R18) thuộc loài *Lactobacillus fermentum* được phân lập từ mắm ruốc Huế. Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng tất cả các chủng khảo sát đều có thể phát triển trong các nồng độ muối từ 5% đến 25% trong thời gian nuôi cấy là 48 giờ. Trong đó, chủng R5 có khả năng chịu muối cao nhất, OD_{600nm} đo được sau khi nuôi cấy chủng R5 trong 48 giờ với nồng độ muối 25% là 0,1864. Vì vậy, chủng này được chọn để xác định khả năng chịu axit, khả năng kết dính và khả năng kháng khuẩn. Số tế bào sống sót của chủng R5 sau ba giờ ủ ở pH 2 là 8,0043 logCFU/ml. Khả năng tự kết dính và đồng kết dính của chủng R5 lần lượt là 23,17% và 24,85%. Khả năng kháng khuẩn của chủng vi khuẩn R5 với chỉ thị *Salmonella* và *E. coli* tương đối cao với đường kính vòng kháng khuẩn dao động trong khoảng 11-12 mm. Bên cạnh đó, chúng tôi còn tiến hành xác định hàm lượng nitơ formol và lượng NH₃ trong nước mắm truyền thống khi bổ sung một lượng tế bào vi khuẩn lactic. Kết quả cho thấy sau một khoảng thời gian khảo sát nhất định, nước mắm đã được bổ sung một lượng tế bào vi khuẩn lactic *Lactobacillus fermentum* R5 có hàm lượng nitơ formol tăng lên và hàm lượng NH₃ giảm xuống.

1. MỞ ĐẦU

Vi khuẩn lactic là những vi khuẩn Gram dương, catalase âm tính, sống trong điều kiện từ vi hiếu khí đến kỵ khí nghiêm ngặt, không có khả năng tạo bào tử, tạo axit lactic là sản phẩm cuối cùng của quá trình lên men carbohydrate. Vì vậy, vi khuẩn lactic có vai trò quan trọng trong đời sống của chúng ta. Chúng là loại vi khuẩn có lợi, có khả năng bảo quản, chế biến và làm tăng giá trị dinh dưỡng cho một số thực phẩm. Nhiều nghiên cứu đã được thực hiện và công bố về nhiều công dụng khác của vi khuẩn lactic. Các chủng vi khuẩn lactic có khả năng chịu muối đã được công bố trong sản phẩm nước mắm, các loại mắm. Chủng vi khuẩn lactic

chịu 25% muối, *Halobacillus thailandensis* sp. nov., được phân lập từ sản phẩm nước mắm Thái Lan. Ngoài khả năng chịu nồng độ muối cao, chủng này còn có khả năng sinh tổng hợp 3 loại protease ngoại bào nên được kết luận là có thể sử dụng để hoàn thiện sự lên men trong sản xuất nước mắm và mắm cá (Chaiyanani và cs., 1999). *Tetragenococcus muriaticus* được phân lập từ mắm cá (sau 6 tháng lên men) có khả năng chịu muối lên đến 30-32% (Kobayashi và cs., 2000). Các chủng vi khuẩn này có mặt trong nước mắm và các loại mắm có tác dụng tạo hương trong quá trình chuyển hóa lên men làm tăng chất lượng của sản phẩm. Các hợp chất mùi chính do chúng tạo thành là

1-propanol, 2-methylpropanal and benzaldehyde (Udomsil và cs., 2010). Bên cạnh khả năng chịu muối ở nồng độ cao, hệ vi khuẩn lactic còn có nhiều tính chất có lợi cho sức khỏe, chức năng probiotic. Chúng vi sinh vật có tính chất probiotic trước hết phải sống sót qua được điều kiện khắc nghiệt của dạ dày. pH của dạ dày người thường dao động trong khoảng 1 đến 4. Một số nghiên cứu khảo sát khả năng sống sót của chủng nghiên cứu ở các khoảng pH từ 1 đến 3 hoặc 4 (Liong và Shah, 2005; Maragkoudakis và cs., 2006). Một số nghiên cứu khác chỉ khảo sát ở pH đại diện của dạ dày (pH = 2 - 2,5) (Maria, 2006; Sangtiago và cs., 2008). Hệ vi khuẩn lactic có thể cạnh tranh không gian với vi khuẩn gây bệnh bằng cách cản chúng bám dính vào thành ruột nên vi khuẩn lactic có thể làm giảm nguy cơ tiêu chảy (Kos và cs., 2003; Rahman và cs., 2008). Ba chỉ tiêu quan trọng trong việc đánh giá khả năng bám dính của vi khuẩn probiotic có liên quan đến tác động của chúng với vật chủ, đó là khả năng tự kết dính, đồng kết dính và bám dính với đường ruột của vật chủ. Đã có nhiều công bố có liên quan đến khả năng bám dính của LAB (Kos và cs., 2003; Greene và cs., 1994). Khả năng sinh tổng hợp bacteriocin của vi khuẩn lactic làm cho chúng ức chế các vi khuẩn gây bệnh đường ruột (Rhys và cs., 2008). Các nghiên cứu về probiotic trên vi khuẩn lactic ở Việt Nam tập trung khảo sát khả năng bám dính, khả năng sinh bacteriocin, khả năng chịu muối mật và axit (Nguyễn Thị Hoài Hà và cs., 2002; Nguyễn Vũ Tường Vy và cs., 2007).

Mắm ruốc Huế là một loại nước chấm đặc trưng được chế biến từ con khuyết và muối với quy trình lên men phức tạp do tác dụng của hệ vi sinh vật trong nguyên liệu. Trong sản xuất nước mắm, vi khuẩn lactic đóng vai trò vô cùng quan trọng. Không chỉ tham gia vào quá trình thủy phân protein để tạo thành axit amin, vi khuẩn

lactic còn góp phần tạo hương vị đặc trưng của nước mắm nhờ quá trình lên men.

Với mục đích cung cấp một phần thông tin về sự đa dạng, tính chất của hệ vi khuẩn lactic có trong mắm ruốc Huế (sản phẩm được lên men từ các nguyên liệu thủy sản với nồng độ muối 10-12%); chúng tôi đã thực hiện đề tài "*Khảo sát một số tính chất có lợi của các chủng vi khuẩn lactic phân lập từ mắm ruốc Huế*".

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Mười chủng vi khuẩn lactic được ký hiệu lần lượt là (R1, R2, R5, R6, R8, R11, R12, R14, R15 và R18) thuộc loài *Lactobacillus fermentum* phân lập từ mắm ruốc Huế đã được định danh bằng các phương pháp MALDI-TOF MS và giải trình tự gen PheS tại phòng thí nghiệm vi sinh, Đại học Ghent, Bỉ.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát khả năng chịu muối

Khả năng chịu mặn của các chủng vi khuẩn lactic được đánh giá qua giá trị OD_{600nm} (mật độ quang – optical density) khi nuôi chúng trong môi trường MRS lỏng có chứa các nồng độ muối tương ứng là 0%, 5%, 10%, 15%, 20% và 25% sau 24 giờ và 48 giờ theo phương pháp của Kobayashi (2004). Phân tích kết quả dựa trên sự so sánh giá trị OD ở các nồng độ muối để đưa ra kết luận khả năng tồn tại và phát triển của các chủng ở các nồng độ muối khác nhau.

2.2.2. Khảo sát khả năng chịu axit

Khả năng chịu axit của chủng khảo sát được đánh giá qua lượng vi khuẩn sống sót sau khi ủ ở pH 2 trong 3 giờ. Số tế bào vi khuẩn sống sót được xác định theo phương pháp đếm khuẩn lạc trên đĩa thạch (Lee và cs., 2011)

2.2.3. *Khảo sát khả năng bám dính*

2.2.3.1. *Khảo sát khả năng tự kết dính* (Kos và cs., 2003)

Sinh khối tế bào của vi khuẩn thu được sau khi nuôi cấy được rửa 2 lần bằng đệm PBS (8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na₂HPO₄; 0,24 g KH₂PO₄; nước cất đủ 1 lít); pH 7,2 vô trùng; sau đó được tái huyền phù trong đệm PBS (OD_{600nm}=1) (OD ban đầu). Để yên huyền phù này ở 37 °C trong 5 giờ để tạo điều kiện cho các vi khuẩn lactic tự kết dính và lắng xuống và đo OD dịch trên bề mặt. Khả năng tự kết dính là phần trăm độ giảm OD_{600nm} dịch bề mặt của mẫu đã để yên 5 giờ so với ban đầu.

2.2.3.2. *Khảo sát khả năng đồng kết dính với Escherichia coli (E. coli)* (Vlková và cs., 2008)

Sau khi rửa 2 lần bằng đệm PBS, sinh khối tế bào của chủng vi khuẩn lactic và *E. coli* được tái huyền phù đến OD_{600nm} = 1. Đồng thời trộn lẫn hai huyền phù này với nhau với thể tích bằng nhau. Tiến hành đo OD_{600nm} dung dịch trên bề mặt sau khi để yên huyền phù của mỗi chủng và hỗn hợp huyền phù của hai chủng ở 37 °C trong 5 giờ. Khả năng đồng kết dính được tính theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ đồng kết dính (\%)} = \frac{\frac{A_X + A_Y}{2} - A_{(X+Y)}}{\frac{A_X + A_Y}{2}} \times 100$$

trong đó A_X là OD_{600nm} sau 5 giờ của vi khuẩn lactic; A_Y là OD_{600nm} sau 5 giờ của *E. coli*; và A_{X+Y} là OD_{600nm} sau 5 giờ của vi khuẩn lactic và *E.coli*.

2.2.4. *Khảo sát khả năng kháng khuẩn*

Sử dụng phương pháp khuếch tán giếng thạch để khảo sát khả năng kháng khuẩn của vi khuẩn lactic theo mô tả của Mishra và Prasad (2005). Theo đó, dịch nổi thu được bằng cách ly tâm (14.000 vòng/phút, 10 phút ở 4 °C) canh trường đã nuôi cấy ở 37 °C trong 24 giờ, được cho vào các giếng thạch đã tạo trên môi trường MRS agar chứa chủng kiểm định (*E. coli*, *Salmonella*). Đĩa thạch sau đó được nuôi

cấy ở 37 °C trong 48 giờ. Sau thời gian nuôi cấy, ghi nhận sự tạo thành vòng vô khuẩn xuất hiện xung quanh giếng thạch.

2.2.5. *Định lượng nitơ formol bằng phương pháp Sorensen*

Định lượng nitơ formol có trong mẫu nước mắm sau khi đã pha loãng đến nồng độ thích hợp rồi xác định gián tiếp lượng amin (Hà Duyên Tư, 2009). Tiến hành nuôi cấy chủng vi khuẩn trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng trong tủ ẩm, sau đó ly tâm thu sinh khối ở 5000 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ 4°C, rửa sinh khối bằng đệm phosphate 0,1M pH 7,2. Tái huyền phù trong đệm PBS sao cho OD_{600nm} ~ 1. Phân phối huyền phù vào nước mắm với mật độ là 10⁸ CFU/ml nước mắm và bảo quản ở tủ ẩm 37°C. Tiến hành phân tích hàm lượng nitơ formol theo các mốc thời gian là 3, 6 và 9 ngày. Kết quả được tính theo công thức:

Số gram nitơ acid amin có trong 1 lít nước mắm:

$$x = \frac{(a - b) \times T \times 0,0007 \times 100 \times 1000}{20 \times V}$$

Trong đó:

- x: lượng gram nitơ acid amin có trong 1 lít nước mắm

- a: số ml dung dịch NaOH 0,05N dùng để chuẩn dung dịch thí nghiệm

- b: số ml dung dịch NaOH 0,05N dùng để chuẩn dung dịch kiểm chứng

- T: hệ số hiệu chỉnh nồng độ của dung dịch NaOH đem dùng so với nồng độ chuẩn.

- V: số ml nước mắm cho vào bình định mức

- 0,0007: số gram nitơ với 1ml NaOH 0,05N

2.2.6. *Xác định hàm lượng NH₃ trong nước mắm bằng phương pháp Kjeldahl*

Phân tích hàm lượng NH₃ trong nước mắm đối chứng và nước mắm có bổ sung chủng vi khuẩn lactic bằng hệ thống chung cất đạm (Hà Duyên Tư, 2009). Chủng được nuôi cấy trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng trong tủ ẩm, sau đó ly tâm thu sinh khối ở

5000 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ 4°C, rửa sinh khối bằng đệm phosphate 0,1M pH 7,2. Tái huyền phù trong đệm PBS sao cho OD_{600nm} ~ 1. Phân phối huyền phù vào nước mắm với mật độ là 10⁸ CFU/ml nước mắm và bảo quản ở tủ âm 37°C. Tiến hành phân tích hàm lượng NH₃ theo các mốc thời gian là 3 ngày, 6 ngày, 9 ngày. Kết quả được tính theo công thức sau:

$$\text{Hàm lượng NH}_3 \text{ (mg/ml)} = \frac{V \times 1,42}{p}$$

Trong đó:

V: số ml H₂SO₄ 0,1N chuẩn độ

1,42: số mg N ứng với 1ml H₂SO₄ 0,1N

p: lượng mẫu phân tích tính bằng ml

2.2.7. Phương pháp toán học xử lý số liệu

Số liệu được tổng hợp và xử lý bằng chương trình Microsoft Excel 2010. Kết quả thí nghiệm được phân tích bằng chương trình One Way ANOVA và kiểm định Tukey trên phần mềm SPSS 18.0 để so sánh các giá trị trung bình có sự sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khả năng chịu muối của hệ vi khuẩn lactic phân lập từ mắm ruốc Huế

Khả năng chịu mặn của các chủng vi khuẩn lactic phân lập từ mắm ruốc Huế được đánh giá qua giá trị OD_{600nm} sau khi nuôi cấy chúng trong môi trường MRS lỏng có chứa các nồng độ muối tương ứng là 0%, 5%, 10%, 15%, 20% và 25% sau 48 giờ. Kết quả thu được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Khả năng chịu muối của hệ vi khuẩn lactic phân lập từ mắm ruốc Huế sau 48 giờ nuôi cấy

Tên chủng	0%	5%	10%	15%	20%	25%
R1	0,3376 ^b	0,7636 ^a	0,1162 ^d	0,1111 ^e	0,1252 ^c	0,0822 ^f
R2	0,3582 ^b	0,8484 ^a	0,2322 ^c	0,1662 ^d	0,1347 ^f	0,1462 ^e
R5	0,2565 ^c	0,8632 ^a	0,4125 ^b	0,2196 ^d	0,1179 ^f	0,1821 ^e
R6	0,1978 ^c	0,8280 ^a	0,3100 ^b	0,1583 ^d	0,1492 ^e	0,1233 ^f
R8	0,2499 ^b	0,8060 ^a	0,1665 ^c	0,1022 ^e	0,1101 ^d	0,0638 ^f
R11	0,2943 ^b	0,8012 ^a	0,0833 ^e	0,0943 ^d	0,1135 ^c	0,0604 ^f
R12	0,3173 ^b	0,6867 ^a	0,1492 ^c	0,1272 ^e	0,1335 ^d	0,0751 ^f
R14	0,3157 ^d	0,8334 ^a	0,4390 ^b	0,3521 ^c	0,1594 ^e	0,1474 ^f
R15	0,2477 ^b	0,8008 ^a	0,1919 ^d	0,2292 ^c	0,1534 ^e	0,1413 ^f
R18	0,3012 ^b	0,8216 ^a	0,1625 ^c	0,1389 ^e	0,1470 ^d	0,0679 ^f

Số liệu xử lý Duncan's theo dòng (chữ cái in thường) thể hiện sự sai khác theo nồng độ muối của từng chủng. Các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác về ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Qua Bảng 1, chúng tôi nhận thấy tất cả các chủng vi khuẩn lactic phân lập được từ mắm ruốc Huế đều có khả năng thích nghi và phát triển ở tất cả các nồng độ muối từ 5% - 25%. Giá trị OD_{600nm} của các chủng vi khuẩn lactic biến thiên qua các nồng độ muối là khác nhau. Trong đó, các chủng vi khuẩn lactic có khả năng thích nghi và phát triển mạnh nhất tại nồng độ muối 5% với giá trị OD của chủng R5 đạt 0,8632 là cao nhất và chủng R12 đạt 0,6867 là thấp nhất sau ở 48 giờ nuôi cấy. Khả năng phát triển của các chủng vi khuẩn lactic tại nồng độ muối 15% giảm so với nồng độ 10%. Ở nồng độ muối 20% và 25% vẫn có khả năng sống sót tuy nhiên sự thích nghi và phát triển của các chủng vi khuẩn lactic có xu hướng giảm so

với các nồng độ khảo sát ở trên. Đặc biệt chủng lactic R5 khả năng sống sót vẫn còn cao ở nồng độ 20% và 25% với giá trị OD lần lượt là 0,1179 và 0,1821.

Tất cả các chủng vi khuẩn lactic phân lập từ mắm ruốc Huế có khả năng thích nghi và phát triển ở các nồng độ muối 5-25%, đều này hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu của Udomsil và cs. (2010) đối với loài *Tetragenococcus halophilus*. Các tác giả đã tiến hành khảo sát khả năng chịu muối của *T. halophilus* tại nồng độ 25% trong các mẫu nước mắm và cho thấy, chúng vẫn sống sót sau bảy tháng trong nước mắm. Juste và cs. (2008) đã công bố rằng *T. halophilus* có khả năng phát triển tại nồng độ muối là 25% và 28,5% ở pH7.

Điều này đã chứng tỏ rằng, khả năng chịu muối của các chủng vi khuẩn lactic được phân lập từ mắm ruốc Huế là cao, trong đó chủng R5 có khả năng thích nghi và phát triển tốt nhất. Chính vì vậy, chủng vi khuẩn lactic R5 phân lập từ mắm ruốc Huế có tiềm năng ứng dụng lớn trong việc sản xuất các sản phẩm lên men chứa nồng độ muối cao như nước mắm, các sản phẩm mắm cá.

3.2. Khả năng chịu axit của *Lactobacillus fermentum* R5 phân lập từ mắm ruốc Huế

Khả năng chịu axit của chủng *Lactobacillus fermentum* R5 được khảo sát bằng cách xác định số tế bào sống qua các mốc thời gian liên tục từ 0 đến 3 giờ trong môi trường pH 2 (Bảng 2).

Bảng 2. Khả năng sống sót của các chủng *Lactobacillus fermentum* R5 trong điều kiện pH 2

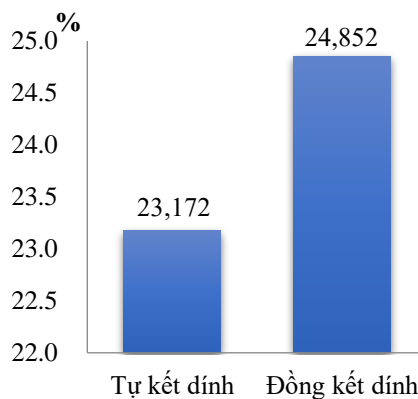
Số tế bào sống còn lại theo thời gian (log CFU/ml)			
0 giờ	1 giờ	2 giờ	3 giờ
9,779	9,685	8,066	7,960

Kết quả trên cho thấy khả năng chịu axit của chủng *Lactobacillus fermentum* R5 là cao. Số tế bào sống sót ở 0 giờ là 9,779 logCFU/ml, nhưng sau 3 giờ thì khả năng sống sót của chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* R5 có xu hướng giảm so với lúc ban đầu (đạt 7,96 logCFU/ml). Kết quả nghiên cứu về khả năng chịu axit phù hợp với nghiên cứu của Maragkoudakis và cs. (2006) khi khảo sát khả năng chịu axit của một số chủng *Lactobacillus* cho thấy các chủng có khả năng chịu axit mạnh nhất là *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* ACA-DC 130, *Lb. plantarum* ACA-DC 146, *Lb. rhamnosus* ACA-DC 112, với mức giảm log CFU/mL từ 8,6 xuống còn lần lượt là 6,8; 5,7 và 7,1 sau 3 giờ ủ ở pH 2.

Chủng *Lactobacillus fermentum* R5 phân lập từ mắm ruốc Huế có khả năng chịu axit tốt đáp ứng được tiêu chí chịu axit của các chủng probiotic.

3.3. Khả năng kết dính của *Lactobacillus fermentum* R5 phân lập từ mắm ruốc Huế

Khảo sát khả năng kết dính của vi khuẩn lactic là nghiên cứu có ý nghĩa thực tiễn. Đây là đặc tính mang lại nhiều lợi ích cho vi khuẩn lactic trong quá trình sinh trưởng và phát triển. Chính vì vậy, chúng tôi đã tiến hành khảo sát khả năng tự kết dính và đồng kết dính với *E. coli* của chủng nghiên cứu *Lactobacillus fermentum* R5. Kết quả được thể hiện ở Hình 1.



Hình 1. Khả năng tự kết dính và đồng kết dính của chủng *Lactobacillus fermentum* R5

Kết quả ở hình 1 cho thấy khả năng bám dính của chủng *Lactobacillus fermentum* R5 ở các điều kiện khác nhau là hoàn toàn khác nhau. Trong đó, khả năng tự kết dính của chủng *Lactobacillus fermentum* R5 với tỷ lệ phần trăm kết dính đạt 23,172%. Chủng này cũng thể hiện khả năng đồng kết dính với *E.coli* nhưng có tỷ lệ cao hơn với giá trị đạt được là 24,852%.

Nhờ có khả năng tự kết dính mà các vi khuẩn lactic cùng một dòng liên kết được với nhau tạo thành các “tổ”, vì thế chúng giúp tăng cường được sức sống và sự phát triển của chủng theo kiểu mối quan hệ hỗ trợ cùng loài. Khả năng tự kết dính còn có sự liên quan đến khả năng bám dính đường ruột và còn làm tăng khả năng lưu lại trong đường tiêu hóa của chủng vi sinh vật. Maria (2006) khi nghiên cứu về đặc điểm sinh lý của một số chủng *Lactobacillus* để tuyển chọn dòng làm probiotic đã đưa ra kết quả về tự kết dính của 11 chủng *Lactobacillus* gồm các loài *Lb. casei*; *Lb. johnsonii*; *Lb. paracasei*; *Lb. rhamnosus* và *Lb. plantanum* với kết quả chủ yếu nằm trong khoảng từ 20% đến 40%. Một kết quả nghiên cứu khác của chúng tôi đã đưa ra tỷ lệ kết dính của chủng *Lactobacillus fermentum* DC1 sau 5 giờ là 24,49% (Đỗ Thị Bích Thủy và cộng sự; 2012). Qua đó có thể nhận thấy khả năng tự kết dính của

chủng *Lactobacillus fermentum* R5 phân lập từ mắm ruốc Huế phù hợp với kết quả công bố của các nhà khoa học trên.

Khả năng đồng kết dính của vi khuẩn lactic với vi sinh vật gây bệnh làm tăng khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh, góp phần cân bằng hệ vi sinh đường ruột. Collado và cs. (2007) đã khảo sát khả năng đồng kết dính của các chủng vi khuẩn lactic và cho thấy sau 4 giờ, tỷ lệ đồng kết dính trong khoảng 6% đến 27%. Kos và cs. (2003) đã nghiên cứu khả năng đồng kết dính của *Lb. acidophilus* M92 (chủng này đang được sử dụng sản xuất chế phẩm probiotic) với *Enterococcus faecium* L3, *Escherichia coli* 3014, *Salmonella* công bố kết quả từ 15,11% đến 19,46%. Các kết quả này cho thấy rằng khả năng đồng kết dính với vi khuẩn gây bệnh của chủng *Lactobacillus fermentum* R5 (24,852%) khá cao nên có thể làm điều kiện sử dụng trong probiotic.

3.4. Kết quả khả năng kháng khuẩn của *Lactobacillus fermentum* R5 phân lập từ mắm ruốc Huế

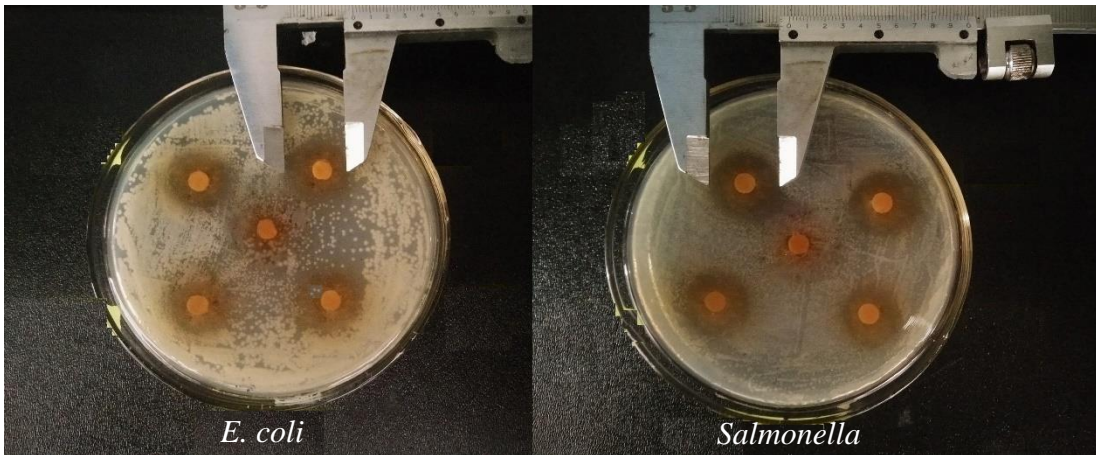
Kết quả kiểm tra tính kháng khuẩn của chủng *Lactobacillus fermentum* R5 thể hiện hoạt tính bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch cho thấy xuất hiện các vòng sáng vô khuẩn với đường kính khác nhau (Bảng 3 và Hình 2).

Bảng 3. Khả năng kháng *E. coli* và *Salmonella* của chủng *Lactobacillus fermentum* R5

Chủng chỉ thị	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)
<i>E. coli</i>	12 ± 0,05
<i>Salmonella</i>	11 ± 0,03

Qua Bảng 3 có thể thấy chủng *Lactobacillus fermentum* R5 có khả năng kháng khuẩn với hai chủng chỉ thị là *E. coli*

và *Salmonella*. Trong đó đường kính vòng kháng với *E. coli* là 12 ± 0,05 mm, đối với *Salmonella* có vòng kháng 11 ± 0,03 mm



Hình 2. Vòng kháng *E. coli* và *Salmonella* của *Lactobacillus fermentum* R5

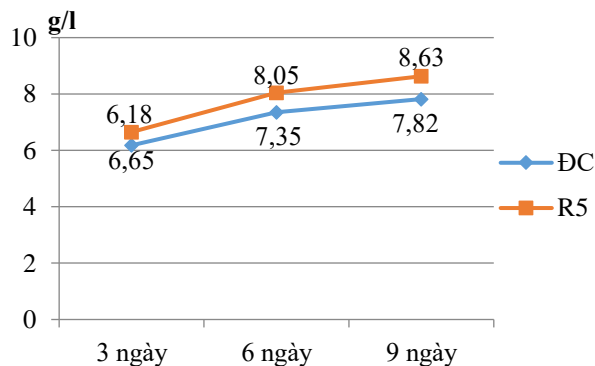
Kết quả nghiên cứu về khả năng kháng khuẩn phù hợp với nghiên cứu của nhiều tác giả. Wakil và cs. (2012) đã khảo sát khả năng kháng *E. coli* và *Salmonella* của các chủng thuộc *Lactobacillus* và cho thấy *L. brevis* kháng *E. coli* với đường kính vòng kháng khuẩn là $10 \pm 0,1$ mm, kháng *Salmonella spp.* là $5 \pm 0,1$ mm, *L. plantarum* kháng *Salmonella* với kích thước vòng kháng khuẩn là $10 \pm 0,1$ mm. Nwafor (2014) đã khảo sát khả năng kháng *E. coli* và *Salmonella typhi* của các loài vi khuẩn lactic *L. acidophilus*, *L. lactic*, *L. bugarius*, *L. casei*, *Leuconotoc sp*, *S. thermophiles*, *S. cremoris*, *S. pyogenes*. Đường kính vòng kháng khuẩn kháng *E. coli* dao động từ $3 \pm$

$0,05$ mm đến $6 \pm 0,25$ mm, đường kính vòng kháng khuẩn kháng *Salmonella typhi* dao động từ $4 \pm 0,2$ mm đến $10 \pm 0,02$ mm. Qua kết quả nghiên cứu có thể thấy chủng *Lactobacillus fermentum* R5 có khả năng kháng khuẩn tốt với hai chủng *E. coli* và *Salmonella*.

3.5. Xác định hàm lượng nito formol và NH₃ có trong nước mắm

3.5.1. Xác định hàm lượng nito formol có trong nước mắm

Kết quả xác định hàm lượng nito formol trong nước mắm khi ta bổ sung chủng *Lactobacillus fermentum* R5 vào trong nước mắm truyền thống được thể hiện ở Hình 3.

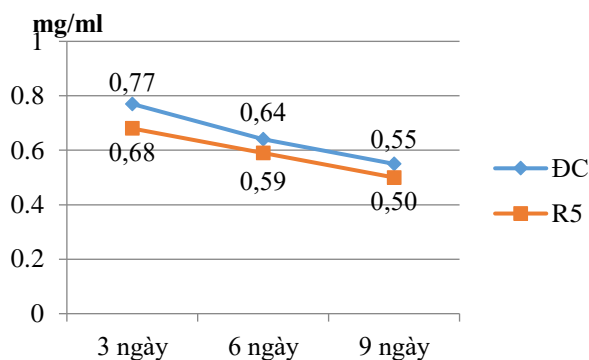


Hình 3. Sự biến đổi của hàm lượng nito formol trong nước mắm khi bổ sung chủng *Lactobacillus fermentum* R5 theo thời gian

Qua Hình 3 ta nhận thấy theo thời gian hàm lượng nito formol của mẫu nước mắm có bổ sung chủng *Lactobacillus*

fermentum R5 cao hơn so với mẫu nước mắm đối chứng. Qua các mốc thời gian 3 ngày, 6 ngày, 9 ngày thì hàm lượng nito

formol có xu hướng tăng lên, cụ thể ở sau 3 ngày hàm lượng nitơ formol trong mẫu nước mắm có bổ sung chủng *Lactobacillus fermentum* R5 là 6,65 g/l và sau 9 ngày thì hàm lượng nitơ formol là 8,63 g/l.



Hình 4. Sự biến đổi của hàm lượng NH_3 trong nước mắm khi bổ sung chủng *Lactobacillus fermentum* R5 theo thời gian

Từ kết quả trên Hình 3 ta nhận thấy theo thời gian hàm lượng NH_3 của mẫu nước mắm có bổ sung chủng *Lactobacillus fermentum* R5 thấp hơn so với mẫu nước mắm đối chứng. Qua các mốc thời gian 3 ngày, 6 ngày, 9 ngày thì hàm lượng NH_3 có xu hướng giảm xuống, cụ thể ở 3 ngày hàm lượng NH_3 của chủng *Lactobacillus fermentum* R5 là 0,68 mg/ml và sau 9 ngày thì hàm lượng nitơ formol là 0,5 mg/ml.

Từ kết quả thể hiện trên Hình 3 và 4, chúng tôi tạm thời nhận định rằng khi bổ sung vào nước mắm một lượng tế bào vi khuẩn lactic *Lactobacillus fermentum* R5 thì qua một khoảng thời gian nhất định hàm lượng nitơ formol sẽ tăng lên và hàm lượng NH_3 sẽ giảm xuống. Vì vậy, bổ sung chủng *Lactobacillus fermentum* R5 giúp cải thiện được chất lượng của nước mắm truyền thống, tăng hàm lượng các chất có lợi và giảm hàm lượng các chất không tốt ở trong nước mắm.

4. KẾT LUẬN

- Tất cả các chủng vi khuẩn lactic thuộc loài *Lactobacillus fermentum* phân lập từ mắm ruốc Huế đều có khả năng chịu

3.5.2. Xác định hàm lượng NH_3 có trong nước mắm

Kết quả xác định hàm lượng NH_3 có trong nước mắm khi ta bổ sung chủng *Lactobacillus fermentum* R5 vào trong nước mắm truyền thống được thể hiện ở Hình 4.

muối NaCl ở các nồng độ 5% đến 25%. Trong đó, chủng được ký hiệu R5 là chủng có khả năng phát triển tốt nhất ở các nồng độ muối. Vì vậy, chủng này đã được chọn để tiến hành khảo sát các chỉ tiêu tiếp theo.

- Một số đặc điểm của *Lactobacillus fermentum* R5 như sau: Số tế bào sống sót của chủng R5 sau ba giờ ủ ở pH 2 là 7,960 log CFU/ml. Khả năng tự kết dính và đồng kết dính với *E.coli* của chủng R5 với tỷ lệ phần trăm kết dính lần lượt đạt 23,172% và 24,852%. Chủng R5 có khả năng kháng khuẩn với hai chủng chỉ thị là *E. coli* và *Salmonella* với đường kính vòng kháng lần lượt là $12 \pm 0,05$ mm và $11 \pm 0,03$ mm.

- Bổ sung vào nước mắm một lượng tế bào vi khuẩn lactic *Lactobacillus fermentum* R5 với mật độ là 10^8 CFU/ml nước mắm thì qua một khoảng thời gian nhất định hàm lượng nitơ formol sẽ tăng lên và hàm lượng NH_3 sẽ giảm xuống.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tài liệu tiếng Việt

Nguyễn Thị Hoài Hà, Phạm Văn Ty và Nguyễn Thị Kim Quy. (2002). Nghiên cứu khả năng sinh tổng hợp bacterioxin của loài

Lactobacillus plantarum L24. *Tạp chí Di truyền học và ứng dụng, Chuyên san Công nghệ sinh học*, 47–52.

Đỗ Thị Bích Thủy và Nguyễn Thị Diễm Hương. (2012). Xác định và khảo sát một số tính chất có lợi của chủng *Lactobacillus fermentum* DC1 phân lập từ sản phẩm dưa cải Huế. *Tạp chí Khoa học, Đại học Huế*, 71(2), 175–185.

Hà Duyên Tư. (2009). Phân tích hóa học thực phẩm. Hà Nội: Nhà xuất bản Khoa học Kỹ Thuật.

Nguyễn Vũ Tường Vy, Nguyễn Văn Thanh và Trần Thu Hoa. (2007). Khảo sát khả năng chịu đựng acid, muối mật và kháng sinh của một số vi sinh vật là nguyên liệu sản xuất probiotic dùng đường uống. *Tạp chí Dược học*, 378, 255–263.

2. Tài liệu tiếng nước ngoài

Chaiyanani, S., Mangel T., Huq, A., Robbi, F. T., & Colwell, R. R. (1999). Polyphasic Taxonomy of a Novel *Halobacillus*, *Halobacillus thailandensis* sp. nov. isolated from Fish Sauce. *Systematic and Applied Microbiology*, 22, 360–365.

Collado, M. C., Meriluoto, J., Salminen, S. (2007). Development of new probiotics by strain combinations: Is it possible to improve the adhesion to Intestinal Mucus?. *Journal of Dairy Science*, 90, 2710–2716.

Greene, J. D., & Kalenhammer, T. R. (1994). Factors involved in adherence of *Lactobacilli* to human Caco-2 cells. *Applied Environment Microbiology*, 60, 4487–4494.

Juste, A., Lievens, B., Frans, I., Marsh, T. L., Klingenberg, M., Michiels, C. W., & Willems, K. A. (2008). Genetic and physiological diversity of *Tetragenococcus halophilus* strains isolated from sugar and salt rich environment. *Microbiology*, 154, 2600–2610.

Kobayashi, K., Wahyuni, M., Hamada-Sato, N., Imada, C., & Watanabe, E. (2004). Effect of culture conditions on lactic acid production of *Tetragenococcus* species. *Journal Appl Microbiol*, 96(6), 1215–21.

Kos, B., Suskovic, M. J., Vukovic, S., Simpraga, M., & Frece, J. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain

Lactobacillus acidophilus M92. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 981–987.

Lee, J., Yun, H. S., Cho, K. W., Oh, S., Kim, S. H., Chun, T., Kim, B., & Whang, K.Y. (2011). Evaluation of probiotic characteristic so newly isolated *Lactobacillus* spp.: Immunomodulation and longevity. *International Journal of Food Microbiology*, 148, 80–86.

Liong, M. T., & Shah, N. P. (2005). Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of *Lactobacilli* strains. *Journal of Dairy Science*, 88, 55–66.

Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, G., Miarisa, C., Kalantzopoulou, G., Potb, B., & Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16, 189–199.

Mishra, V., & Prasad, D. N. (2005). Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *International Journal Food Microbiol*, 103, 109–115.

Nwafor, O. E. (2014). Isolation and identification of lactic acid bacterial (LAB) from yoghurt and antibacterial activity against some clinical isolates. *International Journal of Food Nutrition and Safety*, 5(1), 31–38.

Rahman, M., Kim, W. S., Kumura, H., & Shimazaki, K. (2008). Autoaggregation and surface hydrophobicity of *Bifidobacteria*. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 24, 1593–1598.

Rhys, J. J., Hassan, M. H., Monique, Z., Gale, B., & John, R. T. (2008). Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. *Food Microbiology*, 25, 228–234.

Santiago, R. M., Alberto, M., Marias, J. B., Francisco, P. N., & Maria, G. C. (2008). Screening of lactic acid bacteria and *Bifidobacteria* for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat Science*, 80(3), 715–721.

Udomsil, N., Rodtong, S., Tanasupawat, S., & Yongsawatdigul, J. (2010). Proteinase

- producing halophilic lactic acid bacteria isolated from fish sauce fermentation and their ability to produce volatile compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 141, 186–194.
- Vlková, E., Rada, V., Smehilová, M., & Killer, J. (2008). Auto-aggregation and co-aggregation ability in bifidobacteria and clostridia. *Folia Microbiol (Praha)*, 53(3), 263–269.
- Wakil, S. M., & Osamwonyi, U. O. (2012). Isolation and screening of antimicrobial producing lactic acid bacteria from fermenting millet gruel. *International Research Journal of Microbiology*, 3(2), 072–079.

DETERMINATION OF SOME BENEFICIAL PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM MAM RUOC HUE

Do Thi Bich Thuy*, Nguyen Thi Diem Huong, Dinh Thi Thu Thanh

*Corresponding Author:

Do Thi Bich Thuy

Email:

dothibichthuy@huaf.edu.vn

University of Agriculture and Forestry, Hue University

Received: March 5th, 2019

Accepted: May 2nd, 2019

Keywords: *Lactobacillus fermentum*, Lactic acid bacteria, Mam ruoc Hue, Probiotic, Salt intolerance

ABSTRACT

The study aims to determine the salt tolerance of ten lactic acid strains, denoted as (R1, R2, R5, R6, R8, R11, R12, R14, R15 and R18) of *Lactobacillus fermentum* isolated from mam ruoc Hue. The results of the study showed that all of the strains were able to grow the concentration of NaCl from 5% to 25% during 48 hours of incubation. The R5 strain had the highest salt intolerance. OD600nm measured after incubating the R5 strain for 48 hours containing 25% NaCl was 0.1864. Hence, this strain was selected to study on some properties of probiotic potential, acid intolerance, auto-aggregation and inhibition of bacterial growth. The number of viable cells of the R5 strain after three hours of incubation at pH 2 was 8,0043 logCFU/ml. The ability of autoaggregation was 23,17%, and the coaggregation with *E. coli* was 24,85%. The clear zone with a diameter of 10–12 mm appeared in the inhibition test against *Escherichia coli* and *Salmonella*. In addition, we preliminarily determined of formol nitrogen contents and NH₃ contents in the traditional fish sauce that was added with the number of lactic bacterial cells. The results showed that after a certain period of survey, formol nitrogen contents increased and NH₃ contents reduced in fish sauce.