

NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP VÀ KHẢO SÁT ĐẶC TÍNH VI KHUẨN LACTIC TRONG KHỐI QUẢ CÀ PHÊ LÊN MEN

ISOLATING, CHARACTERIZING LACTIC ACID BACTERIA IN FERMENTED COFFEE

Hoàng Thị Hồng Ánh

Phân viện BHLĐ&BVMT miền Trung; Email: htha17@yahoo.com

Tóm tắt - Nghiên cứu này lựa chọn môi trường tối ưu nhằm phân lập, thuần chủng vi khuẩn lactic trong khối quả cà phê lên men, xác định một số đặc tính của vi khuẩn để làm cơ sở lựa chọn cho bước nghiên cứu tiếp theo về vai trò của vi khuẩn lactic tham gia vào quá trình tạo hương dựa trên khả năng chuyển hóa đường tạo thành các axit hữu cơ. Đề tài đã phân lập được 13 chủng vi khuẩn lactic ký hiệu C1 đến C13. Đồng thời môi trường MRS cơ bản có bổ sung thêm nước vắt cà phê được dùng làm môi trường nuôi sinh khối vi sinh vật. Tiến hành cấy 13 chủng vào môi trường nuôi cấy và khảo sát một số đặc tính, kết quả cho thấy 7 chủng vi khuẩn có thể phát triển trong môi trường nuôi cấy có bổ sung nước vắt cà phê và sinh axit. Trong đó các chủng C5, C12 là sinh axit cao nhất so với 5 chủng còn lại sau thời gian nuôi cấy.

Từ khóa - vi khuẩn lactic; tạo hương cà phê; axit hữu cơ; nước vắt cà phê; chuyển hóa đường.

Abstract - This research chose the best growth media to isolate, homogeneous lactic acid bacteria in fermented coffee and identified some characteristics of bacteria as a basis for the next step study of the role involved in flavor creation process based on the ability to metabolize sugar into organic acids. The research isolated 13 strains of lactic acid bacteria notation C1 – C13. The MRS supplemented with coffee extract was used as a cultural environment for microbial biomass. Thirteen strains in cultural media were tested with some properties and results showed that 7 bacteria can grow in the culture supplemented with coffee water. Among them strains C5 and C12 produce higher acid than the others.

Key words - lactic acid bacteria; flavor creation; organic acids; coffee extract; metabolizing sugar

1. Đặt vấn đề

Hiện nay, “cà phê chồn” là loại cà phê đắt giá và được ưa chuộng nhất trên thế giới về hương vị. Tuy nhiên, loại cà phê này khá hiếm trên thị trường. Vậy điều gì đã khiến cho loại cà phê chồn này có giá trị sử dụng cao như vậy? Chính hệ vi sinh vật yếm khí trong đường ruột của con chồn đã tạo ra hương vị đặc biệt của cà phê.

Quả cà phê tươi sau khi thu hoạch có vị ngọt dịu và màu đỏ ở phần vỏ ngoài, hoàn toàn không có hương thơm. Hương và màu sắc của hạt cà phê chúng ta cảm nhận được chỉ hình thành sau khi “ủ”. Ủ là quá trình lên men yếm khí nhờ hệ vi sinh vật tự nhiên bao gồm: nấm men, nấm mốc và vi khuẩn. Trong đó, nấm men và vi khuẩn lactic là hai tác nhân vi sinh vật có vai trò quan trọng quyết định đến chỉ tiêu chất lượng về hương vị của hạt cà phê sau lên men. Nhiều nghiên cứu khẳng định sự có mặt của nấm mốc, nấm men, vi khuẩn (lactic, axetic, coliform) và một số vi khuẩn gram âm. Trong đó, nhiều chủng vi khuẩn lactic trong khối hạt ủ được phân lập và định tên.

Xuất phát từ bản chất của quá trình lên men yếm khí quả cà phê tươi xảy ra trong hệ thống tiêu hóa của con chồn, chúng tôi chọn vi khuẩn lactic làm đối tượng nghiên cứu quá trình lên men trên quả cà phê tươi sau thu hoạch, nhằm góp phần “công nghiệp hóa” giai đoạn lên men, cải thiện chất lượng về hương vị thay vì chỉ sản xuất cà phê thóc như hiện nay [2].

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Cà phê vối (Robusta) thu hái tại huyện EaH'leo, tỉnh Daklak, các vi khuẩn lactic được tuyển chọn trong quá trình lên men tự nhiên quả sau thu hái.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp vi sinh [1]

- *Phương pháp phân lập vi khuẩn và thuần chủng các chủng lactic.*

- Chuẩn bị môi trường nuôi cấy:

* Môi trường MRS dịch thể (MRS I) của Merck.

* Chuẩn bị nước vắt cà phê: Chuẩn bị nước vắt cà phê: Cân 500g cà phê chín, xay và lọc lấy nước. Lần lượt thêm vào môi trường MRS thạch và MRS dịch thể ở các hàm lượng: 5ml, 10ml, 15ml, 20ml/1000ml môi trường. Sử dụng HCl 1N và NaOH 1N để điều chỉnh pH môi trường MRS về 6,2. Môi trường được thanh trùng ở 121°C trong 15 phút.

* Môi trường MRS bổ sung nước vắt từ quả cà phê chín tươi:

+ MRS II: Môi trường lỏng MRS + 5ml nước vắt cà phê.

+ MRS III: Môi trường lỏng MRS + 10ml nước vắt cà phê.

+ MRS VI: Môi trường lỏng MRS + 15ml nước vắt cà phê.

+ MRS V: Môi trường lỏng MRS + 20ml nước vắt cà phê.

- Lên men cà phê: Quả cà phê sau khi được lựa chọn đem lên men. Cân 500 g cho vào bình thủy tinh 1l, đổ nước ngập quả, đậy nắp để lên men tự nhiên ở nhiệt độ phòng.

- Nuôi cấy và phân lập: Hút 1ml dịch lên men sau 2 ngày pha loãng vào 99ml nước cất vô trùng ở bình tam giác, ta có độ pha loãng 10^{-2} , pha loãng đến 10^{-4} , 10^{-5} . Lấy 0,05ml ở các độ pha loãng 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} nhỏ vào trong hộp petri có chứa môi trường thạch MRS có bổ sung nước vắt cà phê vô trùng. Dùng que gạt dàn đều trên môi trường. Đặt các hộp petri trong tủ ấm ở nhiệt độ 37°C trong 48h. Chọn khuẩn lạc mọc tách biệt nhau, mật độ mỏng để phân lập thuần khiết bằng phương pháp cấy ria lặp lại nhiều lần trên đĩa thạch. Các giống thạch nghiêng được bảo quản trong môi trường thạch MRS ở nhiệt độ 4°C.

Hình thái khuẩn lạc vi khuẩn lactic xuất hiện trên môi trường phân lập được quan sát bằng mắt thường. Các khuẩn lạc của vi khuẩn lactic thường phát triển trên môi trường đặc

có hình tròn, có màu trắng sữa hay vàng nhạt. Tiến hành nhuộm gram, thử catalase, thử oxydase, nhuộm bào tử.

Vi khuẩn lactic được xác định khi những dòng phân lập có hình tròn hoặc hình que, không sinh bào tử, Gram âm, catalase âm tính, oxydase âm tính [1].

- *Phương pháp xác định số tế bào sống/1ml canh trường.*

Chuẩn bị mẫu: Dùng pipet hút 1 ml mẫu cho vào ống nghiệm chứa 9 ml dung dịch pha loãng, khi đó ta sẽ được nồng độ pha loãng là 10^{-1} . Tiếp tục từ ống nghiệm 10^{-1} hút tiếp 1ml và cho vào ống nghiệm chứa 9 ml dung dịch pha loãng pha loãng 10^{-2} . Tiếp tục như vậy, ta thu được các dung dịch mẫu thử tương ứng 10^{-3} , 10^{-4} .

Nuôi cấy mẫu:

- Ghi ký hiệu mẫu và nồng độ dung dịch mẫu thử lên đĩa thạch MRS.

- Dùng pipet vô trùng hút chính xác 0,1ml từ dung dịch mẫu thử ở từng đậm độ nhỏ lên bề mặt đĩa thạch MRS đã được hong khô. Dùng que láng vô trùng, láng đều sao cho dung dịch mẫu thử được phân bố đều trên mặt thạch. Mỗi mẫu thực phẩm phải được nuôi cấy ít nhất 3 đậm độ. Mỗi đậm độ được nuôi cấy trong 2 đĩa thạch MRS và 1 pipet vô trùng riêng.

- Để các đĩa thạch trên mặt phẳng nằm ngang trong vòng 15 phút để dung dịch mẫu thấm hết vào bề mặt thạch. Sau đó lật sấp các đĩa và để vào tủ ẩm 37°C trong 48h.

Xác định khuẩn lạc vi khuẩn lactic ở từng đậm độ.

- Chọn các đĩa không quá 100 khuẩn lạc của 2 đậm độ pha loãng liên tiếp để sơ bộ đọc kết quả.

- Đếm và ghi lại số khuẩn lạc nghi ngờ là vi khuẩn lactic ở từng đậm độ.

- Khảo sát và chọn lọc các chủng vi khuẩn có khả năng sinh axit cao.

Phương pháp định tính khả năng lên men lactic: Phân phối vào mỗi ống nghiệm chứa vi khuẩn lactic 0,5ml dung dịch phenol 3% thêm từ từ từng giọt FeCl_3 1% vào cho đến khi hỗn hợp có màu của phức sắt – phenolate. Cho 1ml axit lactic chuẩn vào ống nghiệm. Axit lactic làm chuyển màu của phức sắt thành màu vàng chanh.

Phương pháp định lượng khả năng sinh axit lactic: Phân phối vào bình tam giác dung tích 100ml: 10ml dịch lên men vi khuẩn, thêm vào 3 giọt phenolphthalein và 20ml nước cất trung tính. Chuẩn độ bằng dung dịch NaOH 0,1N cho đến khi xuất hiện màu hồng nhạt bền vững.

2.2.2. Lựa chọn môi trường

Hút 5% các chủng vi sinh vật được cấy tăng sinh vào eppendorf chứa MRS I, MRS II, MRS III, MRS IV, MRS V. Đem nuôi ở 37°C , tiến hành đo OD sau 48h ở bước sóng $\lambda = 386\text{nm}$ trên máy quang phổ kế Oribeco Hellice Mỹ; đo theo phương pháp này tính bằng đơn vị suy giảm formazin (FAU), khoảng kết quả thể hiện từ 40FAU đến 4000 FAU.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả lựa chọn môi trường

Tất cả các khuẩn lạc có thể là vi khuẩn lactic thường có khuẩn lạc tròn, nhỏ, màu trắng hay vàng ngà mọc trên hộp petri có chứa môi trường thực nghiệm MRS II, MRS III,

MRS IV, MRS V. Chọn các khuẩn lạc đơn có thể là vi khuẩn lactic để đem nuôi cấy trong môi trường MRS lỏng có bổ sung nước vât (MRS II, MRS III, MRS IV, MRS V) và tiến hành đo độ đục sau 48h ở bước sóng $\lambda = 386\text{nm}$, giá trị độ đục càng lớn thể hiện sinh khối của vi khuẩn càng cao. Ký hiệu các khuẩn lạc là $C_1, C_2, C_3, C_4, C_5, C_6, C_7, C_8, C_9, C_{10}, C_{11}, C_{12}, C_{13}$. Kết quả trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng môi trường nuôi cấy đến sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật

Tên chủng	Môi trường thực nghiệm				
	MRS I	MRS II	MRS III	MRS VI	MRS V
C_1	314	290	301	287	282
C_2	299	276	287	272	266
C_3	311	284	260	244	215
C_4	314	274	282	259	223
C_5	373	273	284	246	236
C_6	287	263	283	239	233
C_7	321	291	310	287	270
C_8	310	289	300	276	270
C_9	293	261	254	233	231
C_{10}	303	280	291	289	277
C_{11}	288	270	275	261	254
C_{12}	305	289	295	269	260
C_{13}	320	295	308	289	251

Đánh giá kết quả phát triển của các chủng vi sinh vật trên 5 môi trường cho thấy: Trong môi trường dinh dưỡng MRS I không bổ sung thêm nước vât cả phê tất cả 7 chủng phát triển mạnh nhất; Tiếp đó là môi trường MRS III; MRS II; MRS VI; MRS V.

Môi trường MRS lỏng là môi trường dinh dưỡng tối thích cho sự phát triển sinh khối của vi khuẩn lactic được chứng minh bởi các tác giả Ahmed, Kanwal, Bozoglu, Chirica [3], [4], do đó các chủng phát triển mạnh nhất khi được nuôi cấy trong môi trường này. Việc bổ sung nước vât cả phê vào môi trường dinh dưỡng cơ bản MRS bên cạnh cung cấp một số chất dinh dưỡng như đường, vitamin... thuận lợi cho vi sinh vật phát triển; còn có các hợp chất gây ức chế như tanin, polyphenol... nên nếu bổ sung nước vât với hàm lượng càng cao thì sự phát triển của vi khuẩn càng bị ức chế. Theo đó, kết quả đo sinh khối khi nuôi trong môi trường MRS I sẽ cao nhất và thấp dần ở các môi trường MRS II, MRS III, MRS IV, MRS V. Tuy nhiên kết quả thực nghiệm cho thấy tại môi trường MRS III các chủng phát triển mạnh hơn so với MRS II. Điều đó có thể giải thích là do ảnh hưởng của một số chất trong thành phần nước vât cả phê ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn lactic. Kết quả này cũng tương tự với kết quả của Ojokoh A. O và R. E. Uzeh [5] khi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng nước chiết đu đủ đến sự sinh trưởng và phát triển của nấm men. Ông nhận thấy, khi bổ sung lần lượt 2, 4, 6% nước chiết đu đủ vào môi trường dinh dưỡng cơ bản để nuôi cấy nấm men thì sau 3 ngày nuôi cấy, số tế bào nấm men ở hàm lượng 4% là cao nhất rồi đến 2% và thấp nhất là 6%. Ông giải thích

kết quả đó là bởi ảnh hưởng của nồng độ đường trong nước chiết đủ đủ đến khả năng tạo sinh khối của nấm men.

Do đó, chúng tôi chọn môi trường này (MRS III) làm môi trường giữ giống và nuôi vi khuẩn cho quá trình nghiên cứu. Nước vắt cả phê bổ sung vào môi trường dinh dưỡng cơ bản, mặc dù với hàm lượng rất nhỏ (0,1%) nhưng những thành phần có trong nước vắt sẽ giúp các vi khuẩn phát triển tốt, thích ứng ngay với môi trường khi ứng dụng để lên men khối và phê hạt tươi và chuyển hóa đường thành axit lactic.

Các chủng có thể là vi khuẩn lactic trên tiếp tục được giữ giống và nuôi cấy trên môi trường MRS III để tiến hành xác định hình thái và định tính.

3.2. Kết quả xác định hình thái của vi khuẩn

Các chủng C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃ được thử catalase, nhuộm màu Gram và quan sát hình dạng tế bào. Kết quả được trình bày ở bảng sau:

Bảng 2. Đặc điểm hình thái các chủng vi khuẩn phân lập từ cà phê lên men

Chủng	Hình thái khuẩn lạc	Hình dạng tế bào	Nhuộm Gram	Catalase
C ₁	Màu trắng sữa, tròn, lồi, mép phẳng.	Hình oval	+	+
C ₂	Màu trắng trong, tròn, dẹt, nhỏ.	Hình que dài	+	+
C ₃	Trắng trong, mép phẳng, khuẩn lạc to.	Hình que ngắn	+	-
C ₄	Trắng sữa, dẹt.	Hình cầu	+	-
C ₅	Trắng sữa, tròn, mép phẳng.	Hình que ngắn	+	-
C ₆	Tròn, bề mặt trơn, mép răng cưa.	Hình que ngắn	+	-
C ₇	Trắng trong, mép nhẵn, bề mặt lồi	Hình chuỗi	-	+
C ₈	Trắng sữa, bề mặt xù xì, mép lượn sóng.	Hình chuỗi	+	+
C ₉	Trắng sữa, nhẵn hơi vàng	Que ngắn, mảnh	+	-
C ₁₀	Trắng đục, không lồi.	Hình que	+	+
C ₁₁	Trắng đục, đều, hơi lồi	Hình oval	+	+
C ₁₂	Vàng nhạt, tròn đều, lồi	Hình que ngắn	+	-
C ₁₃	Trắng đục, mép răng cưa	Hình que ngắn	+	-

Kết quả ở bảng 2 cho thấy có 7 chủng được xác định là vi khuẩn lactic, C₃, C₄, C₅, C₆, C₉, C₁₂, C₁₃ (Catalase (-); gram (+)). Các chủng này phát triển được trên môi trường MRS có bổ sung nước vắt cả phê nên sẽ được chọn làm giống cho những nghiên cứu tiếp theo.

3.3. Khảo sát khả năng chuyển hóa đường thành axit lactic và động thái sinh trưởng của các chủng vi khuẩn lactic được phân lập

3.3.1. Kết quả định tính khả năng sinh axit lactic

Để định tính khả năng sinh axit lactic, chúng tôi nuôi 7 chủng vi khuẩn C₃, C₄, C₅, C₆, C₉, C₁₂, C₁₃ trong môi trường MRS dạng lỏng đã lựa chọn (MRS III) và tiến hành định tính. Kết quả thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3. Định tính khả năng sinh axit lactic của các chủng vi khuẩn

Chủng khảo sát	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₉	C ₁₂	C ₁₃
Kết quả	+	+	+	+	+	+	+

Ghi chú +: Sinh axit lactic

Kết quả cho thấy tất cả 7 chủng phân lập C₃, C₄, C₅, C₆, C₉, C₁₂, C₁₃ có khả năng tạo axit lactic (làm chuyển màu tím của dung dịch thuốc thử sang màu vàng chanh như mẫu chuẩn). Như vậy, việc định tính ban đầu cũng như kết quả xác định về hình thái khuẩn lạc và tế bào vi khuẩn sau phân lập, cho phép khẳng định các chủng được lựa chọn đều là vi khuẩn lactic có khả năng chuyển hóa cơ chất (đường) tạo ra axit lactic – là axit hữu cơ quan trọng đối với quá trình tổng hợp tạo hương cho cà phê nhân sau lên men [2].

3.3.2. Kết quả định lượng khả năng tổng hợp axit lactic của các chủng vi khuẩn.

Bảy chủng được nuôi trong môi trường MRS dịch thể ở 37°C, sau đó xác định khả năng sinh axit lactic theo các khoảng thời gian (giờ) theo phương pháp chuẩn độ. Kết quả được trình bày ở bảng 3.4.

Bảng 4. Lượng axit lactic tạo thành của các chủng vi khuẩn

Tên Chủng	Lượng axit tạo thành (mg/l)			
	24h	48h	72h	96h
C ₃	34,78	88,39	82,80	64,42
C ₄	89,47	120,63	115,80	114,87
C ₅	112,72	142,74	158,80	146,86
C ₆	63,57	117,31	111,70	105,91
C ₉	101,62	155,72	148,10	151,04
C ₁₂	117,99	162,88	165,10	144,17
C ₁₃	55,99	120,90	120,30	118,88

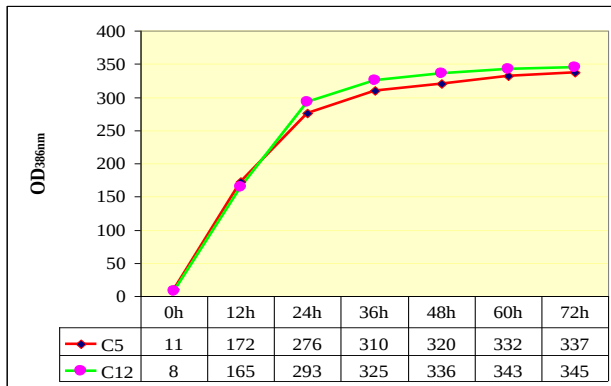
Theo bảng kết quả cho thấy, lượng axit lactic được đo tại các khoảng thời gian khác nhau là khác nhau. Lượng axit lactic tăng dần từ 48h đến 72h đạt cực đại trong khoảng 48h – 72h. Đến 96h thì giảm hẳn (12 ÷ 15%).

Trong khoảng thời gian từ 0h – 24h, hàm lượng axit lactic sinh thành thấp. Nguyên nhân là giống vừa bổ sung nên sinh khối bé, mặt khác chúng phải thích ứng với môi trường mới để tiếp tục sinh trưởng và phát triển. Sau 24 – 48h, các tế bào đã trưởng thành tiến hành tích lũy năng lượng chuẩn bị cho giai đoạn sinh trưởng, sinh sản mạnh. Và khi đạt sinh khối cao, quá trình trao đổi chất diễn ra mạnh mẽ. Do đó, hàm lượng axit đo được tại thời điểm sau 72h nuôi cấy đạt giá trị cực đại đối với tất cả các chủng vi khuẩn thực nghiệm. Sau thời gian 72 giờ nuôi cấy do nguồn dinh dưỡng cạn dần, một số sản phẩm của trao đổi chất được tích tụ lại, pH môi trường thay đổi nên ức chế sự phát triển của vi khuẩn lactic, đồng thời thời gian này cũng chính là giai đoạn “tự diệt vong” trong chu kỳ phát triển của vi sinh vật. Vì vậy, hàm lượng axit giai đoạn sau 72h giảm đáng kể. Lượng axit mất đi có thể do axit tham gia các phản ứng trong môi trường như phản ứng giữa axit lactic với rượu tạo thành trong quá trình lên men [6].

Kết quả thực nghiệm cũng cho thấy hai chủng C₅, C₁₂ có khả năng sinh axit lactic cao nhất tại thời điểm 72h là 158,80 và 165,10(mg/l).

3.4. Khảo sát động thái sinh trưởng của 2 chủng vi khuẩn lựa chọn

Để xác định khả năng sinh trưởng (sinh khối) của vi khuẩn C₅ và C₁₂ chúng tôi tiến hành nuôi các vi khuẩn trong các eppendofit trên môi trường MRS III ở nhiệt độ 37⁰C và đo OD ở bước sóng $\lambda=386\text{nm}$ trong suốt quá trình nuôi cấy ở các khoảng thời gian khác nhau nhau 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72h. Kết quả trình bày hình 1.



Hình 1. Động thái sinh trưởng 2 chủng C₅, C₁₂

Kết quả nghiên cứu cho thấy, thời gian nuôi cấy ảnh hưởng lớn đến sự sinh trưởng và phát triển của các chủng vi khuẩn lactic. Trong khoảng thời gian từ 0 – 36h mật độ tế bào tăng lên rõ rệt bởi đây là giai đoạn các chủng vi khuẩn lactic trong giai đoạn thích ứng và sinh trưởng, phát triển về sinh khối, nên giá trị OD_{386nm} đo được cũng là giá trị sinh khối tích lũy được trong thời gian 36h nuôi cấy. Khoảng thời gian từ 48 – 72h, giá trị sinh khối của hai chủng C₅, C₁₂ có tăng nhưng không đáng kể, điều đó thể hiện các chủng vi khuẩn lactic bước qua giai đoạn phát triển cân bằng và chuyển dần qua giai đoạn suy vong. Điều này xảy ra là do yếu tố môi trường tạo nên như: các chất dinh dưỡng đã cạn kiệt trong môi trường nuôi cấy, pH giảm, có mặt một số chất ức chế... Kết quả sinh khối đo được bao gồm cả tế bào sống và tế bào chết, vì vậy khẳng định 36h là thời gian sinh trưởng và phát triển tốt nhất của hai chủng vi khuẩn. Frederico V. Passos và Henry [6] cũng đưa ra kết quả tương tự khi khảo sát khả năng sinh trưởng và phát triển của *Lactobacillus plantarum*.

Như đã biết: giá trị OD đo được tại bước sóng thích hợp ($\lambda = 386\text{nm}$) khi xác định sinh khối vi sinh vật bao gồm tổng số tế bào có trong canh trường (cả tế bào sống và tế bào chết). Nhưng giá trị sinh học của vi sinh vật chỉ được thể hiện ở tế bào sống. Do đó, rất cần xác định lượng tế bào sống trong tổng lượng tế bào để đánh giá năng lực lên men thực thụ khi sử dụng sinh khối có giá trị OD cực đại (C₅ là 310 và C₁₂ là 325). Chúng tôi tiến hành xác định lượng tế bào sống thông qua đơn vị CFU/ml. Kết quả được biểu diễn trên Bảng 5.

Bảng 5. Số tế bào sống/ml canh trường (CFU/ml) tương ứng với độ pha loãng thập phân

Chủng vi khuẩn	C ₅				C ₁₂			
Độ pha loãng	10 ⁻⁶		10 ⁻⁷		10 ⁻⁷		10 ⁻⁸	
Số lượng khuẩn lạc trên đĩa	11	18	3	7	31	42	16	3
Số vi khuẩn/1ml canh trường (CFU/ml)	18 x 10 ⁷				51 x 10 ⁸			

Vậy, sau 36h nuôi cấy trên môi trường MRS III, sinh khối vi sinh vật đạt giá trị cao nhất và tại thời điểm đó, chủng C₅ tương ứng số tế bào là 18x10⁷ và C₁₂ là 51x10⁸. Chúng tôi chọn canh trường vi khuẩn lactic nuôi cấy trên môi trường MRS III sau 36h để bổ sung vào khối lên men cà phê hạt tươi để nghiên cứu khả năng tạo este của các chủng lựa chọn.

4. Kết luận

Lựa chọn được môi trường thực nghiệm tối ưu (MRS III - môi trường dinh dưỡng MRS cơ bản bổ sung 10ml nước vắt cà phê) nhằm nuôi sinh khối các chủng vi khuẩn lactic phân lập từ cà phê hạt tươi lên men tự nhiên, giúp chúng có khả năng thích ứng tốt với môi trường lên men từ cà phê hạt tươi.

Phân lập được 7 giống vi khuẩn lactic có khả năng chuyển hóa đường thành axit lactic. Từ 7 chủng đã tuyển chọn được 2 chủng C₅ và C₁₂ có khả năng chuyển hóa đường thành axit lactic cao (158,8 và 165,1 mg/l).

Sau 36h nuôi cấy trên môi trường MRS III, 2 chủng C₅, C₁₂ đạt giá trị sinh khối cao nhất tương ứng với số tế bào là 18x10⁷ và 51x10⁸ CFU/ml.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Lân Dũng, Phan Thị Huyền, Nguyễn Ánh Tuyết (2006), *Thí nghiệm vi sinh vật học*, Nxb đại học quốc gia TP. Hồ Chí Minh, TP. Hồ Chí Minh.
- [2] Nguyễn Văn Thoa (2006), *Cơ sở lý thuyết và sản xuất thực phẩm*, Nxb Giáo dục
- [3] Ahmed T and Kanwal R (2004), *Biochemical characteristics of lactic acid producing bacteria and preparation of camel milk cheese by using starter culture*, Pakistan Vet. Journal.
- [4] Bozoglu F, Chirica LC, Yaman O and Gurakan C (1996), *In Lactic acid Bacteria - Current Advances in Metabolism, Genetics and Applications*, Springer.
- [5] Ojokoh A. O and R.E.Uzeh (2005), *Production of Saccharomyces cerevisiae biomass papaya extract medium*, Department of Microbiology, Federal University of Technology.
- [6] Frederico V. Passos, Henry P. Fleming (1994), *Kinetics and Modeling of lactic acid production by Lactobacillus plantarum*, Department of Chemical Engineering, North Carolina state University, Raleigh, North Carolina.