

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CHỦNG VI KHUẨN LACTIC ỨNG DỤNG Ủ CHUA BÃ ĐẬU NÀNH LÀM THỨC ĂN CHĂN NUÔI

ISOLATION AND SCREENING OF LACTIC ACID BACTERIA USING SOYBEAN-RESIDUE FERMENTATION FOR ANIMAL FEED

Phạm Thị Kim Thảo, Nguyễn Thị Anh Tú, Lê Lý Thùy Trâm

Trường Đại học Bách khoa - Đại học Đà Nẵng; ptkthao@dut.udn.vn

Tóm tắt - Nghiên cứu này nhằm mục đích phân lập các chủng *Lactobacillus* spp. có thể lên men bã đậu nành ở nhiệt độ bình thường nhằm tạo nguồn thức ăn chăn nuôi giàu probiotic. Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả đã tuyển chọn được 3 chủng *Lactobacillus* lên men đồng hình từ các nguồn mẫu khác nhau tại chợ Hòa Khánh, Đà Nẵng, có khả năng sinh axit lactic cao gồm chủng L4 $2,06 \pm 0,96$ (mg/ml), L3 $2,10 \pm 0,52$ (mg/ml) và D1 $2,03 \pm 0,34$ (mg/ml), sinh trưởng tốt ở nhiệt độ 35 - 40°C, có thể phát triển trên cả môi trường axit (pH = 3,5), môi trường kiềm (pH = 9,5), phát triển tốt nhất ở pH 6 - 6,5 và môi trường có nồng độ muối cao 5%, có khả năng ức chế mạnh các chủng vi khuẩn gram âm *Escherichia coli* và *Salmonella typhi* (ĐKVVK ≥ 21 mm). Bước đầu thử nghiệm ủ chua bã đậu nành (pH = 5,46 - 5,57), sau 3 ngày pH giảm còn 3,23 - 3,65, hàm lượng axit lactic trên nguồn bã đậu nành lần lượt với chủng D1 là 0,756 mg/ml, chủng L3 0,821mg/ml.

Từ khóa - *lactobacillus*; thức ăn chăn nuôi; bã đậu nành; probiotic; kháng khuẩn.

Abstract - This study aims to isolate *Lactobacillus* spp. strains that are able to ferment soybean residue at normal temperature to produce probiotic-rich animal feed. Three *Lactobacillus* spp. strains are isolated from different samples at Hoa Khanh market in Da Nang city. All isolated strains produce a large amount of lactic acid: 2.06 ± 0.96 mg / ml (L4 strain), 2.10 ± 0.52 mg / ml (L3 strain) and 2.03 ± 0.34 mg / ml (D1 strain), growing well at 35 - 40°C, at the high salt concentration of 5%, in the wide range of pH from 3.5 - 9.5 and strongly inhibiting the growth of *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. They can grow on soybean residue material and reduce pH to 3.23 - 3.65 after 3 days with the acid lactic produced from D1 and L3 strains of 0.756mg/ml and 0.821mg/ml, respectively.

Key words - *lactobacillus*; animal feed; soybean residue; probiotic; anti-bacteria.

1. Đặt vấn đề

Trong nông nghiệp, vi khuẩn lactic được sử dụng để ủ chua thức ăn gia súc cho mục đích bảo quản và làm tăng giá trị dinh dưỡng [1]. Hiện nay, tại Việt Nam chế phẩm sinh học chứa vi khuẩn lactic chủ yếu được nhập khẩu với chi phí cao.

Bã đậu nành thu được sau quá trình sản xuất đậu khuôn còn chứa hàm lượng chất khô (protein, chất xơ, đường) cao. Đây là môi trường lý tưởng cho nhiều vi sinh vật gây bệnh và nấm mốc phát triển, nên khi bổ sung bã đậu nành làm thức ăn chăn nuôi khiến vật nuôi dễ bị đầy hơi, khó tiêu [2]. Do vậy, việc ủ chua bã đậu nành bằng chủng lactic vừa tạo ra nguồn thực phẩm dễ tiêu hóa, vừa giúp bổ sung nguồn lợi khuẩn đường ruột.

Trong quá trình sinh sản vô tính của vi khuẩn lactic có thể xảy ra hiện tượng đột biến, dẫn đến việc di truyền lại cho thế hệ sau hoặc sai sót từ quá trình phân chia tế bào và tác động của điều kiện môi trường sống khác nhau nên sẽ dẫn đến sự sai khác và đa dạng trong kiểu gen cũng như kiểu hình của cùng các chủng vi khuẩn lactic [3]. Vì thế, sẽ tạo ra những dòng thích nghi tốt trong điều kiện về nguồn cacbon, địa lý khác nhau, và đây chính là những dòng rất có ý nghĩa trong nghiên cứu cũng như ứng dụng các chủng vi khuẩn lactic tạo ra các sản phẩm probiotic thích hợp cho chăn nuôi, nuôi trồng thủy hải sản....

Do vậy, việc tuyển chọn các chủng vi khuẩn lactic có hoạt tính sinh học cao từ một số sản phẩm lên men tại chợ Hòa Khánh, sẽ giúp chủ động về nguồn giống, cho nghiên cứu và ứng dụng ủ chua bã đậu nành làm thức ăn chăn nuôi gia súc tại địa phương.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Nguồn phân lập gồm: Cơm mè, trái cây (ổi), nước mĂNG

chua, nước dưa chua, mẩu ruột già của gà, chim cút, nội tạng tôm cá, nước thức ăn thừa (tại các quán cơm, bún ... tại chợ Hòa Khánh, Đà Nẵng).

Bã đậu nành lấy tại 2 hộ gia đình sản xuất đậu khuôn, chợ Hòa Khánh, Liên Chiểu, Đà Nẵng: hộ ông Nguyễn Văn Cường (số 21, đường Vũ Ngọc Phan); hộ bà Nguyễn Thị Linh (số 13, đường Vũ Ngọc Phan).

Chủng vi khuẩn lactic đối chứng: *Lactobacillus plantarum*, Bộ môn Công nghệ Sinh học, Khoa Hóa, Trường Đại học Bách khoa – Đại học Đà Nẵng.

Các chủng vi khuẩn kiểm định gây bệnh bao gồm vi khuẩn *Escherichiacoli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* và *Bacillus cereus* do Trung tâm Chất lượng Nông lâm Thủy sản vùng 2, Đà Nẵng (NAFIQAD) cung cấp.

Hóa chất sử dụng trong thí nghiệm gồm: MRS Broth (Đức), MRSC agar (MRS Broth bổ sung 0,5% CaCO_3 và 1% agar), cao thịt, pepton (Trung Quốc), thuốc thử Kovac (Đức), môi trường thạch mềm BHI (Đức), CaCO_3 , phenol, axit lactic, phenolphthalein, NaOH, gentian violet, fuchsin kiềm, agar, CH_3COONa , cồn.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập

- Mẫu được thu nhận tại chợ trong các ống fancel và túi ni-lông vô trùng.

- Mẫu được pha loãng trong nước muối sinh lý 0,85% ở nồng độ 10^{-4} - 10^{-5} , cấy trải các nồng độ pha loãng trên môi trường MRS có bổ sung CaCO_3 0,5%. Sau 48h nuôi cấy ở 37°C chọn khuẩn lạc tròn, bóng, bìa nguyên, kích thước từ 1-3mm tạo vòng phân giải xung quanh khuẩn lạc [4].

2.2.2. Phương pháp tuyển chọn

Cây chấm điểm các chủng đã được thuần khiết trên đĩa

petri chứa MRS có bổ sung CaCO_3 0,5%, 2 ngày nuôi cấy 37°C, đem quan sát đo kích thước vòng trong xung quanh điểm cấy [5].

2.2.3. Nghiên cứu đặc điểm sinh lý, sinh hóa

Thử các đặc điểm sinh hóa bao gồm: khả năng sinh catalase, khả năng sinh oxidase, sinh khí H_2S , dịch hóa gelatin, sinh indole, sinh axit lactic định tính sử dụng thuốc thử Uffelmann và định lượng sử dụng phương pháp chuẩn độ Therner. Chọn vi khuẩn *Lactobacillus* theo mô tả bởi Martin và Stanley [6].

2.2.4. Nghiên cứu khả năng ức chế của vi khuẩn lactic

Phương pháp nhỏ giọt (Galindo [7]).

Mỗi dòng vi khuẩn *Lactobacillus* được nuôi trong 3 ống nghiệm 10ml (9ml MRS broth/ống), sau 24h hút 5μl dịch nuôi từ mỗi ống nhỏ vào đĩa petri có chứa môi trường MRS agar. Ủ kỵ khí 24h ở 37°C cho khuẩn lạc phát triển. Cho 5ml môi trường thạch mềm BHI (Brain heart infusion) có chứa 0,5% agar và dịch nuôi 24h của chủng vi khuẩn kiểm định vào đĩa MRS agar đã có khuẩn lạc phát triển ở 30°C trong 48h. Dòng vi khuẩn có khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh sẽ tạo ra vòng vô khuẩn xung quanh khuẩn lạc. So sánh vòng vô khuẩn để chọn vi khuẩn có khả năng ức chế mạnh.

2.2.5. Phân tích bã đậu nành

Phân tích bã đậu nành: Xác định đường tổng bằng phương pháp so màu, xác định hàm lượng xenluloza [8], xác định hàm lượng protein tổng số bằng phương pháp Kjeldahl cải tiến [9].

2.2.6. Ứng dụng ủ chua bã đậu nành

Chuẩn bị môi trường lên men yếm khí:

- + Đo pH của bã đậu nành.
- + Cân 70g bã đậu nành, cho vào bình tam giác 100ml làm ấm bằng 70ml nước, hấp ở 121°C trong 10 phút.
- + Nhân giống các chủng L3, L4, D1 trong môi trường MRS (100ml môi trường), sau 24h ở 35°C.
- + Cấy 30ml canh trường nhân giống vào bã đậu nành, đậy kín, đặt vào bể nuôi yếm khí. Nuôi cấy tĩnh chủng vi khuẩn lactic trên môi trường bã đậu nành, ở nhiệt độ phòng trong điều kiện yếm khí, xác định hàm lượng axit lactic và trị số pH ở các thời điểm 0, 3, 5, 7 và 10 ngày.

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Kết quả phân lập, tuyển chọn

Việc phân lập dựa trên khả năng tạo vòng phân giải xung quanh khuẩn lạc khi cấy trên môi trường MRS chứa CaCO_3 0,5% từ 10 mẫu thí nghiệm. Dựa vào đặc điểm khuẩn lạc và vòng phân giải xung quanh khuẩn lạc nhóm tác giả thu được 14 chủng khác nhau. Tuy nhiên, để đáp ứng cho việc lên men bã đậu nành làm thức ăn chăn nuôi nhóm tác giả tiến hành tuyển chọn dựa vào các tiêu chuẩn sau:

- + Chủng vi khuẩn lactic lên men đồng hình;
- + Tạo axit lactic cao, chịu pH axit;
- + Có khả năng lên men ức chế vi khuẩn gây bệnh và gây thối;
- + Ủ chua được bã đậu nành ở điều kiện nhiệt độ phòng, yếm khí.

Tiến hành tuyển chọn sơ bộ với kích thước vòng phân giải CaCO_3 , khả năng lên men đồng hình và hàm lượng axit lactic, nhóm tác giả ghi nhận kết quả ở Bảng 1:

Bảng 1. Kết quả phân lập các chủng vi khuẩn sinh axit lactic

STT	Kí hiệu	Vòng phân giải CaCO_3 D-d (mm)	Phản ứng với thuốc thử Uffelmen	Sinh khí	Hàm lượng axit lactic (mg/ml)
0	ĐC	9	+	-	0,74±0,22
1	L1	16	+	+	1,37±0,14
2	L4	24	+	-	2,06±0,96
3	L3	31	+	-	2,10±0,52
4	L2	20	+	-	1,87±0,21
5	O1	15	+	+	1,22±0,39
6	T2	21	+	+	1,91±0,33
7	P	17	+	-	1,52±0,4
8	M1	12	+	-	1,12±0,24
9	M2	20	+	+	1,75±0,42
10	G1	16	+	-	1,53±0,67
11	T1	17	+	-	1,43±0,19
12	D1	22	+	-	2,03±0,34
13	T3	12	+	-	1,03±0,27
14	P1	10	+	-	0,83±0,32

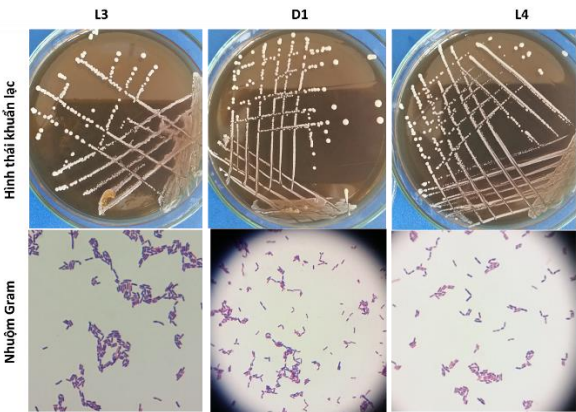


Hình 1. Vòng phân giải CaCO_3 chủng D1

Phân tích kết quả Bảng 1 cho thấy tất cả các chủng phân lập có tạo vòng phân giải CaCO_3 , dương tính với thuốc thử Uffelmen. Điều này khẳng định các chủng phân lập là vi khuẩn sinh axit lactic, và khả năng sinh axit lactic của 14 chủng phân lập cao hơn chủng đối chứng *L. plantarum* (ĐC), minh họa Hình 1 vòng phân giải CaCO_3 của chủng D1 (22 mm) lớn hơn chủng đối chứng (9 mm). Trong 14 chủng lactic phân lập có 4 chủng L4, L3, T2, D1 cho kích thước vòng phân giải lớn, hàm lượng axit lactic cao so với các chủng còn lại, nhưng T2 sinh khí nên các chủng L4, L3, D1 được lựa chọn cho nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Các đặc điểm hình thái và sinh hóa của 3 chủng vi khuẩn tuyển chọn

Nhóm tác giả tiến hành quan sát đặc điểm khuẩn lạc, hình thái tế bào sử dụng kính hiển vi quang học, độ phóng đại 1.000X, nhuộm Gram, thử nghiệm các đặc điểm sinh hóa [6], kết quả mô tả ở Hình 2.



Hình 2. Đặc điểm khuẩn lạc và hình thái tế bào nhuộm Gram (1.000X)

Nhìn chung 3 chủng vi khuẩn trên đều có khuẩn lạc tròn lồi, kích thước dao động từ 1,0 - 3,0 mm, màu trắng sữa, mép trơn, bề mặt khuẩn lạc bóng ướt, gồ cao. Quan sát dưới kính hiển vi cả 3 chủng L3, L4, D1 đều có hình que, tế bào dạng đơn hay xếp thành đôi, thành chuỗi ngắn, thuộc nhóm G+.

Bảng 2. Một số đặc điểm hình thái, sinh hoá của 3 chủng vi khuẩn phân lập

Kí hiệu chủng	L4	L3	D1
Nguồn phân lập	Cơm mẻ	Cơm mẻ	Nội tạng chim cút
Hình dạng khuẩn lạc	Tròn lồi, mép trơn, trắng	Tròn, mép trơn, lồi trắng ngà, lớn	Tròn, mép trơn, trắng sữa, nhỏ
Hình dạng tế bào	Hình que ngắn, chuỗi	Hình que dài, đơn hoặc đám	Hình que ngắn, đơn hoặc đám
Gram	+	+	+
Sinh acid lactic	+	+	+
Catalase	-	-	-
Oxidase	-	-	-
Amylase	-	-	-
H ₂ S	-	-	-
Indol	-	-	-
Dịch hóa gletin	-	-	-

Phân tích kết quả Bảng 2, thông qua các đặc điểm sinh hóa đã nghiên cứu và dựa vào mô tả của Martin & Stanley (2006), có thể khẳng định rằng những chủng vi khuẩn L4, L3, D1 là vi khuẩn lactic thuộc chi *Lactobacillus*.

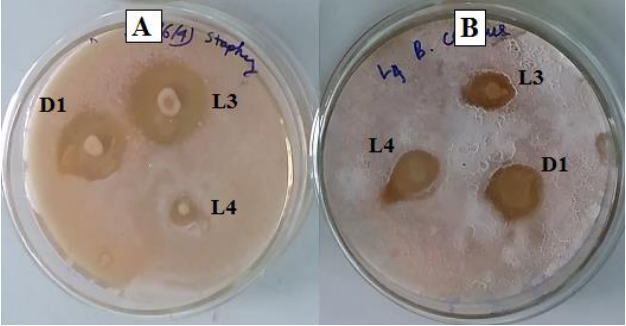
3.3. Các đặc điểm sinh trưởng của chủng vi khuẩn L4, L3, D1

Nhóm tác giả tiến hành thử nghiệm khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh, nồng độ muối, nhiệt độ và pH phát triển, khả năng ủ chua bã đậu nành.

3.3.1. Khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh

Phương pháp nhỏ giọt giúp biết được khả năng ức chế chủng vi khuẩn gây bệnh bằng tất cả các thành phần mà vi

khẩn lactic tiết ra trong quá trình sinh trưởng (axit lactic, ethanol, bacteriocin, diacetyl...), kết quả minh họa được thể hiện ở Hình 3 và tổng hợp trên Bảng 3.



Hình 3. Khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh

(A) Khả năng ức chế *S. aureus* của chủng D1, L3, L4;
(B) Khả năng ức chế *B. cereus*

Bảng 3. Khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh

Vi khuẩn thuốc nhóm	Tên chủng vi khuẩn kiểm định	Khả năng ức chế chủng vi khuẩn gây bệnh ĐKVVK = D - d (mm)		
		L4	L3	D1
Gram dương	<i>S. aureus</i>	1,67±0,33	22,33±0,33	18,67±0,33
	<i>B. cereus</i>	1,23±1,00	3±0,43	1,95±1,00
Gram âm	<i>E. coli</i>	21,67±0,33	23,00±1,00	21,00±1,00
	<i>S. typhi</i>	23,00±1,00	21,67±0,33	23,33±0,33

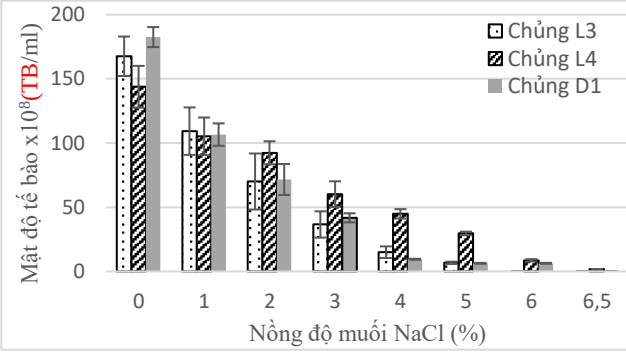
D: đường kính vòng trong suốt; d: đường kính khuẩn lạc;
ĐKVVK: Đường kính vòng vô khuẩn

Qua kết quả khảo sát ở Bảng 3 và xét về khả năng ức chế theo quy ước của Galindo (2004), nhận thấy:

- Đối với *S. aureus*, chủng L3 có khả năng ức chế mạnh (ĐKVVK ≥ 21 mm), D1 ức chế mức độ trung bình (6mm ≤ ĐKVVK ≤ 20 mm), L4 ức chế yếu (1mm ≤ ĐKVVK ≤ 5mm).
- Đối với *B. cereus*, cả 3 chủng L3, L4 và D1 ức chế yếu.
- Đối với các chủng vi khuẩn gram (-) gồm *E. coli* và *S. typhi*, thì cả 3 chủng phân lập đều ức chế mạnh.

3.3.2. Nồng độ muối ảnh hưởng đến sinh trưởng

Nuôi cấy các chủng trong môi trường MRS lỏng có các nồng độ muối cần khảo sát 0, 1, 2, 4, 6, 6,5%. Theo dõi khả năng sinh trưởng dựa vào mật độ tế bào (TB). Kết quả được khái quát trên đồ thị Hình 4.



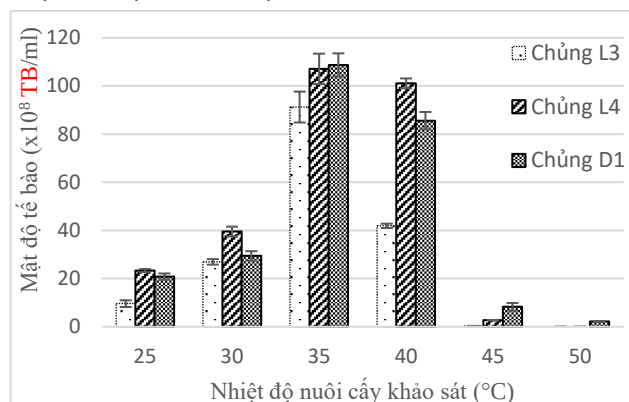
Hình 4. Ảnh hưởng của nồng độ muối đến sự phát triển

Nồng độ muối 4,4% có thể ức chế vi sinh vật gây bệnh, nồng độ 6% kìm hãm hoạt động của enzyme và ngăn cản sự phát triển của nha bào, làm giảm sức chịu nhiệt của vi khuẩn. Kết quả nghiên cứu Hình 4 cho thấy cả 3 chủng

phân lập đều có khả năng phát triển trong điều kiện môi trường có nồng độ muối cao (NaCl = 5%). Tuy nhiên, đến ở nồng độ muối 6% chỉ có L4 ($8,59 \times 10^8$ TB/ml) và D1 ($6,29 \times 10^8$ TB/ml) có khả năng phát triển, L3 không phát triển. Ở nồng độ muối 6,5% chỉ có L4 phát triển với mật độ tế bào $1,76 \times 10^8$ TB/ml. Như vậy, cả 3 chủng phân lập có khả năng thích ứng với môi trường rất tốt ở nồng độ muối 5%. Đây là đặc điểm thuận lợi khi lên men bã đậu nành ở điều kiện thường với nồng độ muối cao sẽ ức chế các chủng vi khuẩn gây thối.

3.3.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng

Để quá trình ủ chua bã đậu nành tiến hành đơn giản, cần có chủng vi khuẩn lactic có thể sinh trưởng tốt ở điều kiện thường, do vậy nhóm tác giả tiến hành khảo sát nhiệt độ sinh trưởng của chủng vi khuẩn lactic phân lập từ 25 - 50°C, sau thời gian nuôi cấy 24 giờ, kết quả thí nghiệm được thể hiện trên đồ thị Hình 5.



Hình 5. Ảnh hưởng nhiệt độ đến sự phát triển

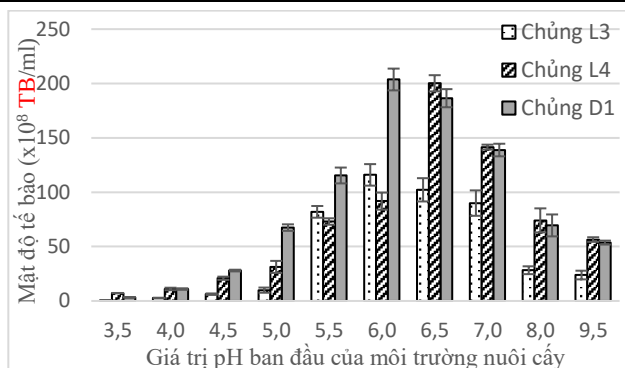
Ở đây, nhận thấy sự phát triển của các chủng phụ thuộc rõ rệt vào nhiệt độ. Khả năng này tốt nhất trong dãy nhiệt độ 35°C - 40°C đối với chủng L4 và D1. Mật độ tế bào đạt mức cao tại 35°C sau 24h nuôi cấy của chủng L3 ($91,24 \times 10^8$ TB/ml) và D1 ($104,74 \times 10^8$ TB/ml), đối với L4 mật độ tế bào đạt $107,09 \times 10^8$ TB/ml.

Tại nhiệt độ 45°C, các chủng L3 ($0,33 \times 10^8$ TB/ml), L4 ($2,7 \times 10^8$ TB/ml) và D1 ($8,29 \times 10^8$ TB/ml) vẫn phát triển, tuy nhiên mật độ tế bào thấp. Tại 50°C, chỉ có D1 có thể sinh trưởng ($2,24 \times 10^8$ TB/ml).

Như vậy, nhiệt độ phát triển của các chủng *lactobacillus* L4, L3 phân lập từ 25°C - 45°C, D1 từ 24°C - 50°C, sinh trưởng tốt nhất trong khoảng nhiệt độ 35°C - 40°C, đây là khoảng nhiệt gần nhiệt độ cơ thể, nên các chủng phân lập cũng thích hợp để bổ sung nguồn lợi khuẩn cho vật nuôi. Ở khoảng nhiệt độ 25°C - 35°C là các khoảng nhiệt độ gần môi trường nhiệt đới nóng ẩm tại địa phương, các chủng vi khuẩn đều có thể phát triển tốt, đặc điểm này có lợi cho việc tăng số lượng nhanh chóng, chiếm ưu thế trong giai đoạn đầu của quá trình ủ chua đậu nành làm thức ăn chăn nuôi, và khi đến giai đoạn nhiệt độ khởi ủ tăng cao chủng D1 vẫn sinh trưởng được, điều này giúp hạn chế các chủng vi khuẩn gây thối và gây bệnh.

3.3.4. Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy

Tiến hành khảo sát sự ảnh hưởng pH ban đầu của môi trường nuôi cấy đến sự phát triển các chủng L4, L3, D1, nhóm tác giả xử lý kết quả và ghi nhận ở đồ thị Hình 6.



Hình 6. pH ban đầu của môi trường nuôi cấy ảnh hưởng đến sự phát triển

Quan sát đồ thị Hình 6 cho thấy rằng cả 3 chủng đều có khả năng phát triển ở khoảng pH rộng 3,5 - 9,5, có thể sinh trưởng trong môi trường axit pH = 3,5 và cả môi trường kiềm pH = 9,5.

Như vậy, pH ban đầu thích hợp cho sự tăng sinh khối tế bào của các chủng L3, D1 tại pH = 6, đối với L4 là tại pH = 6,5. Đặc biệt, chúng có khả năng sống được trong môi trường kiềm pH = 9,5. Đây là đặc điểm có lợi cho hoạt tính kháng khuẩn vì đa số vi khuẩn gây bệnh đều ưa thích môi trường kiềm.

3.3.5. Khảo sát nguyên liệu bã đậu nành

Để xác định thành phần hóa học của bã đậu nành tươi của 2 hộ gia đình tại chợ Hòa Khánh, nhóm tác giả sấy bã đạt độ ẩm 10,33%, được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4. Một số thành phần hóa học của bã đậu nành tươi

Hộ gia đình	Một số thành phần hoá học của bã đậu nành có độ ẩm 10,33% (g/100g)			Bã đậu nành tươi	
	Protein	Cellulose	Đường tổng	Độ ẩm (%)	pH
Bà Linh	7,33	77,65	4,47	49,45	5,49
Ông Cường	7,01	75,91	6,44	60,23	6,23

Kết quả Bảng 4 cho thấy, với bã tươi nhóm tác giả xác định độ ẩm của bã tươi 49,45% - 60,23%, giá trị pH = 5,49 - 6,23, khoảng giá trị này thích hợp cho sự sinh trưởng của các chủng vi khuẩn lactic L4, L3, D1 phân lập.

Hàm lượng đường tổng trong bã đậu nành thu nhận từ 2 hộ gia đình bà Linh và ông Cường lần lượt là 4,47 và 6,44 g/l, cao hơn lượng đường nguồn bã đậu nành tại nhà máy Vinasoy trong nghiên cứu của tác giả Trương T.M Hạnh ($3,82 \text{g}/100\text{g}$) [2]. Điều này có khả năng phụ thuộc vào nguồn hạt đậu nành, quy trình chiết xuất dịch sữa... Hàm lượng đường tổng trong bã đậu nành của hộ gia đình ông Cường cao hơn, nên nguồn bã đậu này được thử nghiệm tiếp.

3.3.6. Khả năng ủ chua bã đậu nành

3 yếu tố quyết định cho sự phát triển của vi khuẩn lactic khi ủ chua thức ăn là điều kiện yếm khí, đủ đường và mật độ tế bào. Tuy nhiên ở đây, nhóm tác giả thử nghiệm lên men chỉ với nguồn dinh dưỡng duy nhất là bã đậu nành, chỉ bổ sung thêm nước. Bước đầu thử nghiệm ủ chua bã đậu nành, nhóm tác giả đánh giá thông qua hàm lượng axit lactic, sự thay đổi pH môi trường lên men theo thời gian và nhóm tác giả ghi nhận kết quả ở Bảng 5.

Bảng 5. Khả năng ủ chua bã đậu nành của chủng vi khuẩn lactic phân lập

Thời gian lên men (ngày)	L4		L3		D1	
	pH	Acid lactic (mg/ml)	pH	Acid lactic (mg/ml)	pH	Acid lactic (mg/ml)
0	5,42	0	5,57	0	5,46	0
3	4,91	0,225	3,23	0,828	3,65	0,756
5	5,05	0,1665	3,19	1,017	3,29	0,945
7	5,85	0,135	3,21	1,062	3,31	0,963
10	5,9	0,1125	3,28	1,089	3,61	0,9765

Khả năng lên men bã đậu nành ở điều kiện yếm khí được đánh giá thông qua sự giảm pH của môi trường sau thời gian ủ 3 - 10 ngày. Phân tích kết quả ở Bảng 5 cho thấy, đối với môi trường bã đậu bổ sung chủng L4, pH môi trường dường như không giảm, điều này chứng tỏ chủng L4 không có khả năng sinh trưởng trên môi trường bã đậu nành. Đối với chủng L3 và D1, sau 3 ngày nuôi cấy, pH giảm từ 5,57 xuống 3,23 bã có mùi chua. Lên men 3 ngày đưa pH môi trường từ pH = 5,57 xuống pH = 3,23, là quá trình lên men điển hình của vi khuẩn lactic [10]. Như vậy, chỉ có chủng L3 và D1 có khả năng ủ chua bã đậu nành.

4. Kết luận

Đã phân lập được 3 chủng vi khuẩn lactic L3, L4, D1 thuộc chi *Lactobacillus* có khả năng sinh lactic cao và có khả năng ức chế chủng vi khuẩn gram âm gây bệnh: *E. coli* và *S. typhi*. Cả 3 chủng đều có khả năng phát triển ở nồng độ muối 5%, L4 có thể phát triển ở nồng độ muối 6,5%, nhiệt độ phát triển tốt nhất là từ 35°C - 40°C, D1 có thể sinh trưởng ở nhiệt độ 50°C.

Khảo sát được thành phần hóa học của bã đậu nành thu

nhận ở 2 hộ gia đình sản xuất đậu khuôn tại chợ Hòa Khánh với hàm lượng đường tổng khá cao.

Ghi nhận 2 chủng có khả năng ủ chua bã đậu nành ở điều kiện yếm khí, nhiệt độ phòng là chủng *Lactobacillus* L3 và *Lactobacillus* D1.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Lý Kim Bảng, Lê Thanh Bình, Tạ Kim Chinh, “Ứng dụng vi khuẩn lactic trong việc bảo quản thức ăn xanh cho trâu bò”, *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp*, Tập 10, 1998, trang 455 - 457.
- [2] Trương Thị Minh Hạnh, Nguyễn Thị Thanh Tịnh, “Nghiên cứu quá trình thủy phân-lên men axit xitric từ bã đậu nành bằng *Aspergillus oryzae* và *Aspergillus niger*”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Đại học Đà Nẵng*, Số 01(62), 2013, trang 54-59.
- [3] 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 Hà Nội”, *Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, Số 24, 2008, trang 221-226.
- [4] Hoàng Quốc Khánh, Phạm Thị Lan Thanh, “Phân lập, định danh và xác định các chủng *Lactobacillus* có tiềm năng probiotic từ con người”, *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ*, 14(6), 2011, trang 62-76.
- [5] Whittenhry R., “The use of soft agar in the study of conditions effecting the utilization of fermentable substrates by lactic acid”, *J. Microbiol*, 32, 1973, pp. 372-375.
- [6] Martin D., Stanley F., *The Prokaryotes-A Handbook on the Biology of Bacteria*, Springer, 2006, pp. 320-372.
- [7] Galindo, A. B., *Lactobacillus plantarum 44A as a live feed supplement for freshwater fish*, Ph.D Thesis, 2004, pp. 1 – 131.
- [8] Nguyễn Văn Mùi, *Thực hành hóa sinh học*, NXB Đại học Quốc gia Hà Nội, 2007.
- [9] Viện Thổ nhưỡng Nông hoá, *Sổ tay phân tích đất nước phân bón cây trồng*, NXB Nông Nghiệp, 1998.
- [10] R. E. Levin, *Lactic acid and propionic acid fermentation of fish hydrolyzates processing: Biotechnological applications*, edited by A. M. Martin, London, 1994.

(BBT nhận bài: 18/12/2017, hoàn tất thủ tục phản biện: 02/01/2018)