

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN LACTIC TỪ NEM CHUA THANH HOÁ THEO ĐỊNH HƯỚNG ỨNG DỤNG TRONG LÊN MEN THỊT

Nguyễn Thị Ngọc Anh^{1*}, Nguyễn Thị Phương Thảo¹, Lê Thanh Hải Hà¹,
Nguyễn Thị Thu Hiền¹, Nguyễn Thành Chung¹, Vũ Thị Hồng Chính², Mai Hoàng Hiệp³

*Tác giả liên hệ, email: ngocanhcnsh@hou.edu.vn, ORCID: 0009-0008-9125-2233

Ngày tòa soạn nhận được bài báo: 02/07/2025

Ngày phản biện đánh giá: 06/01/2026

Ngày bài báo được duyệt đăng: 20/01/2026

DOI: 10.59266/houj.2026.1123

Tóm tắt: Nem chua Thanh Hóa là sản phẩm thịt lên men truyền thống chứa nhiều vi khuẩn lactic (LAB), đóng vai trò then chốt trong quá trình lên men và bảo quản. Nghiên cứu nhằm phân lập, tuyển chọn và đánh giá các chủng LAB tiềm năng làm giống khởi động. Mẫu nem chua được thu thập ngẫu nhiên từ các cơ sở sản xuất truyền thống tại Thanh Hóa. Tổng cộng 23 chủng LAB được phân lập trên môi trường MRS bổ sung 0,5% CaCO₃, sàng lọc sơ bộ theo hình thái khuẩn lạc, nhuộm Gram và khả năng sinh acid lactic. Các chủng tiềm năng được đánh giá khả năng sinh enzyme và hoạt tính kháng khuẩn. Chủng NCI.08 nổi bật với khả năng sinh amylase và protease (đường kính vòng phân giải 21±0,6 mm và 26±0,3 mm), đồng thời có phổ kháng khuẩn rộng đối với *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 6538, *S. enterica* ATCC 14028, *E. faecalis* ATCC 19433 và *K. pneumoniae* ATCC 10031, với vòng kháng 9-12 mm. Chủng này thể hiện khả năng sinh acid lactic cao, làm giảm đáng kể giá trị pH môi trường sau 48 giờ nuôi cấy. Giải trình tự gen 16S rRNA xác định NCI.08 thuộc loài *Lactobacillus sakei* (99,7%). Kết quả cho thấy NCI.08 giàu tiềm năng cho sản xuất giống khởi động, cần nghiên cứu thêm về độ an toàn và hiệu quả ở quy mô bán công nghiệp.

Từ khóa: giống khởi động, *Lactobacillus sakei*, nem chua Thanh Hoá, vi khuẩn lactic

I. Đặt vấn đề

Vi khuẩn lactic (lactic acid bacteria, LAB) là nhóm vi sinh vật Gram dương, không sinh bào tử, có khả năng lên men carbohydrate tạo acid lactic, hợp chất chính góp phần bảo quản thực phẩm, ổn

định hệ vi sinh và cải thiện đặc tính cảm quan (Rachwał & Gustaw, 2024). Với đặc tính an toàn sinh học cao, LAB đã được Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) công nhận là vi sinh vật an toàn (GRAS) và được sử dụng phổ

¹ Trường Đại học Mở Hà Nội

² Bệnh viện Đa khoa Quốc tế Vinmec

³ Sinh viên, Trường Đại học Mở Hà Nội

biến rộng rãi trong nhiều loại thực phẩm truyền thống (Plavec & Berlec, 2020). Nhiều chủng LAB được sử dụng như giống khởi động (starter culture) trong quá trình lên men các sản phẩm thịt, sữa, rau và ngũ cốc (Hassanzadazar & Ehsani, 2013). Trong công nghệ thực phẩm lên men, giống khởi động cần có khả năng sinh acid lactic mạnh, tạo hoạt tính kháng khuẩn thông qua acid hữu cơ hoặc bacteriocin, đồng thời tiết enzyme ngoại bào (protease, amylase, lipase) để cải thiện hương vị, cấu trúc và đảm bảo an toàn sản phẩm. Nghiên cứu này tiến hành tuyển chọn các chủng LAB dựa trên các đặc tính công nghệ nêu trên (Hassanzadazar & Ehsani, 2013).

LAB không chỉ tạo acid lactic mà còn có khả năng tổng hợp các hợp chất kháng khuẩn như bacteriocin, diacetyl, hydrogen peroxide, giúp ức chế vi sinh vật gây hư hỏng hoặc gây bệnh, qua đó nâng cao độ an toàn và kéo dài thời hạn bảo quản của thực phẩm (Noordiana & cộng sự, 2013). Trong công nghiệp thực phẩm, giống khởi động là chế phẩm vi sinh vật chứa một lượng lớn tế bào sống có khả năng chủ động thúc đẩy và kiểm soát quá trình lên men. Nhóm LAB thường đóng vai trò trung tâm trong các chế phẩm này (Leroy & De Vuyst, 2004). Hiện nay, xu hướng nghiên cứu tập trung vào việc phân lập và tuyển chọn các chủng LAB bản địa từ thực phẩm truyền thống vốn đã thích nghi tốt với nguyên liệu và điều kiện sản xuất đặc thù. Điều này không chỉ giúp nâng cao hiệu quả lên men mà còn góp phần bảo tồn đa dạng sinh học vi sinh vật và phát triển các chế phẩm vi sinh nội địa có giá trị ứng dụng cao (Holzapfel, 2002).

Tại Việt Nam, nem chua là sản phẩm thịt lên men phổ biến, chứa nguồn

LAB phong phú, nhiều chủng có khả năng sinh acid lactic mạnh, hoạt tính kháng khuẩn và tiềm năng probiotic (Dương & cộng sự, 2023). Tuy nhiên, nghiên cứu về đặc tính công nghệ của LAB từ nem chua phục vụ phát triển giống khởi động vẫn còn hạn chế. Do đó, nghiên cứu này nhằm phân lập, tuyển chọn các chủng LAB tiềm năng từ nem chua Thanh Hóa. Các tiêu chí đánh giá gồm: khả năng sinh acid lactic, enzyme (amylase, protease), hoạt tính kháng khuẩn và định danh loài bằng trình tự gen 16S rRNA. Kết quả kỳ vọng góp phần bổ sung dữ liệu về LAB bản địa từ thực phẩm truyền thống và đề xuất chủng LAB có đặc tính sinh học, công nghệ ưu việt cho sản xuất thực phẩm lên men quy mô bán công nghiệp.

II. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu nem chua được thu thập ngẫu nhiên tại các cơ sở sản xuất nem chua truyền thống uy tín tại một số phường trên địa bàn tỉnh Thanh Hoá (phường Hàm Rồng, Ba Đình và Hạc Thành). Các mẫu đều là sản phẩm nem chua thương mại đã hoàn thành quá trình lên men (3-5 ngày), có khối lượng trung bình 40-50 g/thanh, được gói bằng lá chuối theo phương thức truyền thống. Sau khi thu thập, mẫu được bảo quản lạnh ở 0-4 °C cho đến khi phân tích.

Các chủng vi khuẩn kiểm định gồm: *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 6538, *S. enterica* ATCC 14028, *E. faecalis* ATCC 19433, *K. pneumoniae* ATCC 10031 được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Công nghệ cao, Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Mở Hà Nội.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn lactic

Một gam nem chua được nghiền nát pha loãng sơ cấp với 9mL nước cất vô trùng, tiếp tục pha loãng thập phân liên tiếp đến 10^{-8} . Từ mỗi độ pha loãng, lấy 300 μ L dịch cấy trải trên thạch MRS bổ sung 0,5% CaCO_3 , ủ ở 37 °C và quan sát sau 24, 48, 72 và 96 giờ. Các khuẩn lạc LAB điển hình (tròn, nhẵn, trắng ngà hoặc vàng nhạt, có vòng phân giải CaCO_3) được chọn, cấy chuyển lặp lại trên MRS để thuần hóa, đảm bảo đơn dòng phục vụ nghiên cứu tiếp theo.

2.2.2. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn lactic tuyển chọn

Đặc điểm hình thái: Các chủng LAB được nuôi trên môi trường MRS lỏng, ở 37°C, lắc 150 vòng/phút, sau 24h thu nhận dịch huyền phù chứa tế bào và tiến hành nhuộm bằng phương pháp nhuộm Gram, quan sát hình thái tế bào dưới kính hiển vi điện tử ở độ phóng đại 1000 \times (dầu soi).

Đánh giá khả năng sinh enzyme ngoại bào: Hoạt tính amylase và protease được đánh giá bằng phương pháp đục lỗ thạch. Mẫu LAB sau nuôi 48 giờ (37 °C, 150 vòng/phút) được ly tâm (5000 vòng/phút) thu dịch enzyme thô. Đối với amylase, 100 μ L enzyme thô được cho vào lỗ thạch trên môi trường LB chứa 1% tinh bột tan, ủ 5-6 giờ ở 37 °C, sau đó nhỏ lugol 5% để xác định đường kính vòng phân giải (D-d, mm) (Nguyễn & Nguyễn, 2013). Đối với protease, sử dụng môi trường thạch sữa gầy (SMA), enzyme được bổ sung vào lỗ thạch (9 mm), ủ 24 giờ ở 37 °C; vùng trong suốt quanh lỗ cho thấy khả năng thủy phân casein. Phương pháp được điều chỉnh từ phép thử khuếch tán qua lỗ thạch trên SMA (Phyu & cộng sự, 2015).

Đánh giá khả năng kháng vi khuẩn kiểm định: Phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch được áp dụng (Dhanasekaran & cộng sự, 2012). Dịch nuôi 48 giờ được ly tâm, lấy 100 μ L dịch nổi nhỏ vào lỗ thạch trên đĩa LB 1,5% agar đã cấy vi khuẩn kiểm định. Sau 18-24 giờ ủ, đo đường kính vòng vô khuẩn (D-d, mm) để đánh giá hoạt tính kháng khuẩn.

Đánh giá khả năng sinh acid lactic: Xác định theo phương pháp chuẩn độ Therner (ADPI, 2023). Lấy 5mL dịch nuôi 48 giờ (đã ly tâm), trộn với 10mL nước cất và 2-3 giọt phenolphthalein (1% trong ethanol 90°). Chuẩn độ bằng NaOH 0,1 N đến khi xuất hiện màu hồng nhạt bền trong 30 giây. Hàm lượng acid lactic được tính theo công thức:

$$\text{Hàm lượng acid lactic (g/L)} = \frac{(V_{\text{NaOH}} \times N \times 90,08)}{V_{\text{mẫu}}}$$

(Trong đó: V_{NaOH} : thể tích dung dịch NaOH; N: nồng độ NaOH; 90,08 là khối lượng mol của acid lactic, $V_{\text{mẫu}}$: Thể tích dịch mẫu thử)

2.2.3. Định danh chủng vi khuẩn tuyển chọn bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Chủng LAB có hoạt tính tốt được nuôi cấy, định danh bằng sinh học phân tử qua phân tích trình tự gen 16S rRNA. ADN tổng số được tách chiết theo Sambrook và Russell (2001), làm khuôn khuếch đại gen 16S rRNA với môi đặc hiệu 27F và 1492R (Genset). Trình tự 16S rRNA thu được được so sánh với dữ liệu công bố trên GenBank bằng BLAST (NCBI) để xác định độ tương đồng. Cây phát sinh loài được xây dựng bằng MEGA11 nhằm phân tích mối quan hệ di truyền của các chủng LAB với các loài đã biết.

2.2.4. Phương pháp phân tích số liệu

Các thí nghiệm được tiến hành ít nhất ba lần độc lập và kết quả được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn (SD). Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2016 để tính toán các thống kê mô tả cơ bản (giá trị trung bình, độ lệch chuẩn), phục vụ cho việc phân tích và so sánh kết quả.

III. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Phân lập các chủng vi khuẩn lactic từ mẫu nem chua Thanh Hoá

Các mẫu nem chua truyền thống được pha loãng tuần tự từ 10^{-5} đến 10^{-8} ,



a. Pha loãng 10^{-5}



b. Pha loãng 10^{-8}

Hình 3.1. Phân lập LAB dựa trên khả năng phân giải CaCO_3 .

Tất cả 23 chủng được nuôi cấy trên môi trường MRS lỏng ở 37°C trong 48 giờ, sau đó nhuộm Gram và quan sát dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại $1000\times$. Kết quả cho thấy toàn bộ đều có hình thái tế bào dạng que (từ ngắn đến dài), đầu tròn hoặc có mấu, bắt màu Gram dương (tím), đặc trưng của LAB. Khi nuôi trong môi trường MRS lỏng, các chủng đều tạo mùi chua nhẹ, dấu hiệu đặc trưng cho khả năng sinh acid lactic. Những chủng phân lập này tiếp tục được sử dụng để đánh giá các đặc tính sinh học và tiềm năng ứng dụng trong quá trình lên men thực phẩm.

sau đó cấy trên môi trường MRS bổ sung $0,5\%$ CaCO_3 để sàng lọc vi khuẩn lactic (LAB). Trên môi trường này, các chủng LAB sinh acid lactic tạo vòng phân giải CaCO_3 do acid lactic tiết ra phản ứng với CaCO_3 , hình thành muối canxi lactat tan (Afoakwa & cộng sự, 2008). Những khuẩn lạc có vòng phân giải rõ rệt được chọn lọc và ký hiệu từ NC1.01 đến NC1.23. Ghi nhận hình thái khuẩn lạc cho thấy sự đa dạng về màu sắc (trắng đục, trắng sữa, vàng nhạt đến vàng đậm), kích thước (1-4 mm), hình thái bề mặt (trơn nhẵn hoặc có nếp nhăn, vòng hoặc lõm giữa) và dạng ria (tròn đều, chia thùy hoặc không đều).

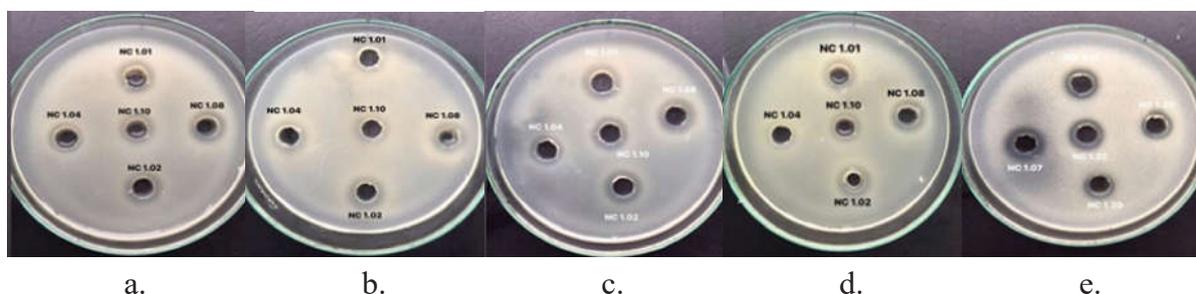
3.2. Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của các chủng LAB phân lập

Trong nghiên cứu này, 23 chủng LAB phân lập từ nem chua Thanh Hóa được đánh giá hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Mỗi chủng được nuôi trong môi trường MRS lỏng ở 37°C , lắc 150 vòng/phút trong 48 giờ, sau đó ly tâm (5.000 vòng/phút, 10 phút) để thu dịch. Tiếp theo, 100 μL dịch được nhỏ vào các lỗ đường kính 9mm trên đĩa chứa vi khuẩn kiểm định. Sau 24 giờ ủ ở 37°C , đo đường kính vòng vô khuẩn (D-d, mm) để đánh giá hoạt tính kháng khuẩn.

Năm chủng vi khuẩn kiểm định gồm *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, và *Enterococcus faecalis* đều là các vi sinh vật liên quan đến hệ vi sinh đường ruột người, có khả năng gây rối loạn tiêu hóa hoặc nhiễm trùng cơ hội.

Kết quả cho thấy 12/23 chủng (NC1.01, NC1.02, NC1.04, NC1.05, NC1.07, NC1.08, NC1.09, NC1.10, NC1.11, NC1.20, NC1.22, NC1.23) ức chế ít nhất 1/5 chủng kiểm định. Trong đó, NC1.08 cho vòng ức chế lớn nhất

(12 mm với *S. aureus* ATCC 6538 và *K. pneumoniae* ATCC 10031; 10 mm với *E. faecalis* ATCC 19433 và *E. coli* ATCC 25922; 9 mm với *S. enterica* ATCC 14028). NC1.02 xếp thứ hai với vòng ức chế 12 mm đối với *S. aureus* ATCC 6538 và 10 mm đối với bốn chủng còn lại. Mười chủng khác ức chế từ 1 đến 4/5 vi khuẩn kiểm định, trong khi NC1.19 không tạo vòng ức chế nào. Những kết quả này cho thấy một số chủng LAB bản địa là ứng viên tiềm năng để nghiên cứu đặc tính chất kháng khuẩn và khả năng ứng dụng trong lên men thực phẩm.



Hình 3.2. Hình ảnh kháng khuẩn của một số chủng LAB phân lập được

Ghi chú: a. Với *S. aureus* ATCC 6538; b. Với *S. enterica* ATCC 14028; c. Với *E. faecalis* ATCC 19433; d. Với *E. coli* ATCC 25922; e. Với *K. pneumoniae* ATCC 10031

3.3. Đánh giá khả năng sinh enzyme ngoại bào

Hoạt tính protease của các chủng LAB được xác định bằng phương pháp khuếch tán thạch trên môi trường skim milk agar (SMA). Dịch nuôi cấy sau ly tâm được nhỏ vào lỗ thạch, ủ ở 37 °C trong 24h, vòng phân giải quanh lỗ chứng tỏ sự thủy phân casein, thành phần gây đục chính của SMA bởi protease ngoại bào.

Bảng 3.1. Khả năng sinh enzyme ngoại bào của các chủng LAB

STT	Chủng LAB	Hoạt tính enzyme (D-d, mm)	
		Amylase	Protease
1	NC1.07	38±0,6	-
2	NC1.08	21±0,6	26±0,3
3	NC1.16	-	25±0,1
4	NC1.17	-	26±0,1

Ghi chú: Kết quả được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (Mean ± SD, n = 3). "-": Không có hoạt tính enzyme.

Hoạt tính amylase được đánh giá tương tự trên môi trường thạch tinh bột tan, sau 6 h ủ, thêm lugol 1% và quan sát vòng phân giải màu trắng. Kết quả trình bày ở bảng 3.1 và hình 3.3 cho thấy NC1.08, biểu hiện cả hai enzyme với đường kính vòng phân giải amylase và protease lần lượt $21 \pm 0,6$ mm và $26 \pm 0,3$ mm. NC1.07 phân giải tinh bột mạnh nhất ($38 \pm 0,6$ mm), trong khi NC1.16 và NC1.17 chỉ tạo vòng protease ($25 \pm 0,1$ mm và $26 \pm 0,1$ mm).



Hình 3.3. Hình ảnh phân giải protein (a.) và tinh bột tan (b.) của 1 số chủng LAB phân lập

3.4. Xác định hàm lượng acid lactic và khả năng làm giảm pH môi trường của các chủng LAB phân lập được

Trong lên men thực phẩm, khả năng sinh acid lactic là yếu tố then chốt giúp giảm pH môi trường, từ đó ức chế vi sinh vật gây hư hỏng, nâng cao độ ổn định vi sinh và góp phần tạo cấu trúc đặc trưng cho sản phẩm, như trong nem chua (Doungkhwan & cộng sự, 2017). Vì vậy, đánh giá khả năng hạ pH và sinh acid của LAB là bước sàng lọc quan trọng trong lựa chọn chủng giống. Trong nghiên cứu này, các chủng LAB phân lập từ nem chua Thanh Hóa được nuôi trong môi trường MRS lỏng ở 37 °C, lắc 150 vòng/phút trong 48 giờ. Dịch nuôi được thu bằng ly tâm ở 5.000 vòng/phút. Độ giảm pH được xác định bằng máy đo pH, trong

khi hàm lượng acid lactic sinh ra được xác định bằng phương pháp chuẩn độ Themer, sử dụng NaOH 0,1 N và chỉ thị phenolphthalein để đánh giá tiềm năng sản sinh acid của từng chủng.

Kết quả phân tích được trình bày trong bảng 3.2., các chủng LAB có khả năng sinh acid lactic dao động từ 9,01 đến 15,31 g/L. Các chủng NC1.05, NC1.08, NC1.14 và NC1.21 đạt hàm lượng acid lactic cao nhất (15,31 g/L), trong khi các chủng NC1.17 và NC1.15 chỉ tạo ra lần lượt 9,01 và 9,91 g/L. Giá trị pH môi trường sau lên men nằm trong khoảng từ 4,01 đến 5,06, cho thấy phần lớn các chủng LAB có khả năng làm giảm pH đáng kể, ngoại trừ chủng NC1.16 có pH = 7,366, nghi ngờ không có hoạt động lên men acid.

Bảng 3.2. Giá trị pH và hàm lượng acid lactic của các chủng LAB phân lập

Tên chủng	Độ pH	Hàm lượng acid lactic (g/L)	Tên chủng	Độ pH	Hàm lượng acid lactic (g/L)
NC1.01	4,397±0,01	14,05±0,01	NC1.13	4,272±0,11	14,41±0,05
NC1.02	4,311±0,01	13,87±0,01	NC1.14	4,025±0,01	15,31±0,02
NC1.04	4,926±0,02	12,61±0,01	NC1.15	4,725±0,15	9,91±0,12
NC1.05	4,234±0,01	15,31±0,002	NC1.16	7,366±0,20	4,86±0,15
NC1.07	4,397±0,005	14,41±0,01	NC1.17	5,059±0,12	9,01±0,06
NC1.08	4,044±0,03	15,31±0,02	NC1.18	4,818±0,07	9,93±0,07
NC1.09	4,010±0,01	15,21±0,05	NC1.19	4,898±0,01	9,91±0,02
NC1.10	4,668±0,001	12,25±0,12	NC1.20	4,690±0,05	12,16±0,05
NC1.11	4,322±0,01	14,95±0,06	NC1.21	4,254±0,01	15,31±0,03
NC1.12	4,190±0,03	14,77±0,11	NC1.22	4,381±0,12	13,51±0,05
NC1.03	4,305±0,01	13,51±0,15	NC1.23	4,218±0,05	14,77±0,05

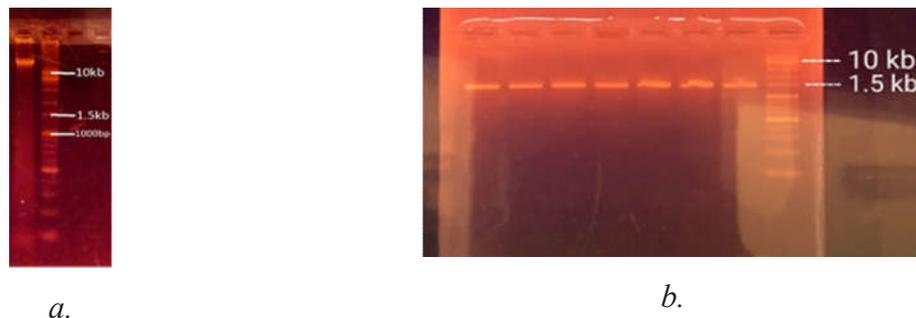
Ghi chú: Kết quả trình bày dưới dạng Mean ± SD (n = 3).

Nghiên cứu cho thấy các chủng LAB phân lập từ nem chua Thanh Hóa có khả năng sinh acid lactic và giảm pH môi trường tương đương hoặc cao hơn so với một số nguồn tương tự. Cụ thể, theo Dương và cộng sự (2023), các chủng LAB từ nem chua Cần Thơ tạo ra hàm lượng acid lactic trong khoảng 18,23-19,13 g/L, với pH thấp nhất đạt 3,65. Trong khi đó, LAB phân lập từ xúc xích I-San (Thái Lan) chỉ đạt hàm lượng acid lactic tối đa 11,7 g/L và pH thấp nhất 4,35 (Doungkhwan & cộng sự, 2017). Như vậy, các chủng từ nem chua Thanh Hóa thể hiện hiệu suất lên men tương đương các chủng ưu việt từ nem chua Cần Thơ và cao hơn so với giá trị được báo cáo đối với LAB phân lập từ xúc xích I-San. Những dữ liệu này cho thấy tiềm năng ứng dụng các chủng LAB bản địa trong phát triển giống khởi động nhằm nâng cao chất lượng và độ an toàn của sản phẩm nem chua truyền thống.

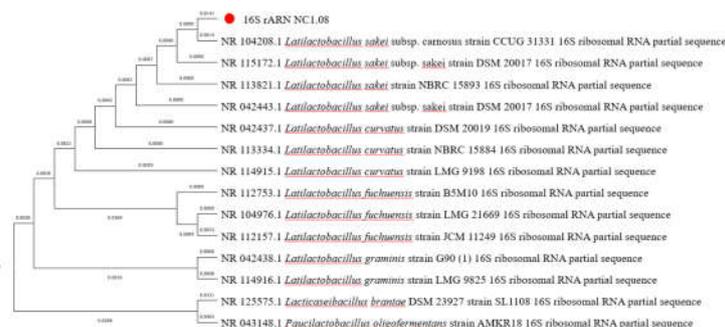
3.5. Định danh chủng vi khuẩn lactic tuyển chọn bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Dựa trên các tiêu chí đã đánh giá (khả năng sinh acid, hoạt tính enzyme và phổ kháng khuẩn), chủng NC1.08 được lựa chọn để định danh phân tử.

Chủng NC1.08 được nuôi trong MRS lỏng (37 °C, 150 vòng/phút, 48 giờ). Sau ly tâm (5.000 vòng/phút, 4 °C, 10 phút), sinh khối được tách ADN tổng số theo Sambrook & Russell (2001). ADN hòa tan trong nước khử ion, điện di gel agarose 1% cho thấy băng duy nhất >10 kb, xác nhận tách chiết thành công (Hình 3.4.a). ADN này làm khuôn PCR khuếch đại gen 16S rRNA với mồi 27F/1492R, thu sản phẩm ~1,5 kb (Hình 3.4.b). Sau tinh sạch, sản phẩm được giải trình tự, phân tích BLAST cho thấy 99,72% tương đồng với *Latilactobacillus sakei*. Cây phát sinh loài bằng MEGA11 củng cố kết luận: NC1.08 thuộc *L. sakei*, ký hiệu *Latilactobacillus sakei* NC1.08.



Hình 3.4. Hình ảnh chạy điện di DNA tổng số (a.) và đoạn gen 16S rRNA (b.) của chủng NC1.08



Hình 3.5. Cây phát sinh loài dựa trên trình tự 16S rDNA của chủng NC1.08

IV. Kết luận và kiến nghị

Từ nem chua Thanh Hóa, nghiên cứu đã phân lập 23 chủng vi khuẩn lactic, trong đó NC1.08 nổi bật với khả năng sinh acid lactic cao (15,31 g/L), hạ pH môi trường xuống 4,044 và ức chế cả 5 chủng vi khuẩn kiểm định. Chủng này đồng thời sinh amylase và protease, hỗ trợ thủy phân nguyên liệu và hình thành hương vị. Giải trình tự 16S rDNA xác định NC1.08 có độ tương đồng 99,7% với *Latilactobacillus sakei*, loài phổ biến trong thực phẩm lên men, có giá trị ứng dụng cao. Với khả năng sinh acid lactic cao, biểu hiện hoạt tính enzyme ngoại bào và phổ kháng khuẩn rộng, *L. sakei* NC1.08 có tiềm năng làm chủng khởi động cho sản xuất nem chua và các sản phẩm lên men. Tuy nhiên, cần tiến hành thêm các đánh giá về an toàn sinh học, tính ổn định di truyền và thử nghiệm quy mô bán công nghiệp trước khi ứng dụng thực tiễn.

Tài liệu tham khảo

- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., & Ryan, A. (2008). Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A critical review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(9), 840-857. <https://doi.org/10.1080/10408390701719272>
- American Dairy Products Institute (ADPI). (2023). *Analytical Method #007: Determination of Titratable Acidity (Version 2.0)*. https://adpi.org/methodsofanalysis/analytical-method-007/?utm_source=chatgpt.com
- Dhanasekaran, D., Thajuddin, N., & Panneerselvam, A. (2012). Applications of actinobacterial fungicides in agriculture and medicine. In D. Dhanasekaran, N. Thajuddin, & A. Panneerselvam (Eds.), *Fungicides for plant and animal diseases* (pp. 29-54). InTechOpen. <https://doi.org/10.5772/25549>
- Doungkhwan, P., Tavitchasri, P., Laosinwattana, C., Ngamyeesoon, N., & Pilasombut, K. (2017). Comparison of fermentation process in Thai fermented pork sausage (I-San sausage) on quality and safety. *International Journal of Agricultural Technology*, 13(7.3), 2205-2217.
- Duong, T. H. N., Mai, T. H., Lur, B. H., Lý, T. X. M., & Bùi, T. Q. H. (2023). Phân lập, tuyển chọn dòng vi khuẩn lactic trong nem chua thịt có tiềm năng ứng dụng làm vi khuẩn giống trong sản xuất nem chua. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 59(3B), 86-93. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2023.136>
- Hassanzadazar, H., & Ehsani, A. (2013). Phenotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from traditional Koopeh cheese. *Global Veterinaria*, 10(2), 147-152. <https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2013.10.2.6615>
- Holzapfel, W. H. (2002). Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal of Food Microbiology*, 75(3), 197-212. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00707-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00707-3)
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>
- Nguyễn, T. M., & Nguyễn, M. T. (2013). Phân lập và tuyển chọn một số chủng vi khuẩn lactic có khả năng sinh tổng hợp amylase và bacteriocin. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*, (3), 3-10.
- Noordiana, N., Fatimah, A. B., & Mun, A. S. (2013). Antibacterial agents produced by lactic acid bacteria isolated from threadfin salmon and grass shrimp. *International Food Research Journal*, 20(1), 117-124. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/10.5555/20133175536>

- Phyu, H. E., Oo, Z. K., & Aye, K. N. (2015). Screening on proteolytic activity of lactic acid bacteria from various yogurts and fermented milk. *International Journal of Advances in Science Engineering and Technology, Special Issue, 5*, 34-37.
- Plavec, T. V., & Berlec, A. (2020). Safety aspects of genetically modified lactic acid bacteria. *Microorganisms, 8*(2), 297. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020297>
- Rachwał, K., & Gustaw, K. (2024). Lactic acid bacteria in sustainable food production. *Sustainability, 16*(8), 3362. <https://doi.org/10.3390/su16083362>
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

ISOLATION AND SELECTION OF LACTIC ACID BACTERIA FROM THANH HOA FERMENTED PORK (NEM CHUA) TOWARD APPLICATION IN MEAT FERMENTATION

Nguyen Thi Ngoc Anh¹, Nguyen Thi Phuong Thao¹, Le Thanh Hai Ha¹, Nguyen Thi Thu Hien¹, Nguyen Thanh Chung¹, Vu Thi Hong Chinh², Mai Hoang Hiep³

Abstract: Thanh Hoa fermented pork (*nem chua*) is a traditional fermented meat product rich in lactic acid bacteria (LAB), which play a crucial role in fermentation and preservation. This study aimed to isolate, select, and evaluate potential LAB strains as starter cultures. *Nem chua* samples were randomly collected from traditional producers in Thanh Hoa. A total of 23 LAB strains were isolated on MRS agar supplemented with 0.5% CaCO₃ and preliminarily screened based on colony morphology, Gram staining, and lactic acid production. Potential strains were further evaluated for enzyme production and antibacterial activity. Strain NCI.08 exhibited outstanding amylase and protease activities (clear zone diameters of 21 ± 0.6 mm and 26 ± 0.3 mm, respectively) and showed a broad antibacterial spectrum against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella enterica* ATCC 14028, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, with inhibition zones ranging from 9 to 12 mm. This strain also demonstrated strong acid production, significantly reducing the pH after 48 h of incubation. 16S rRNA gene sequencing identified NCI.08 as *Lactobacillus sakei* (99.7% similarity). These findings indicate that NCI.08 possesses high potential as a starter culture for *nem chua* production; however, further studies on its safety and performance at semi-industrial scale are warranted.

Keywords: starter cultures, *Lactobacillus sakei*, Thanh Hoa fermented pork, lactic acid bacteria

¹ Hanoi Open University

² Vinmec International Hospital

³ Student, Hanoi Open University