

## PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VI KHUẨN LACTIC VÀ ỨNG DỤNG TRONG LÊN MEN NEM CHUA NẤM RƠM (*Volvariella volvacea*)

Trương Thị Thúy Nguyên, Lê Thị Minh Thu, Trần Ngọc Hân,  
Nguyễn Thị Mỹ Tiên, Mai Hoài Anh, Nguyễn Ngọc Thanh,  
Bùi Hoàng Đăng Long, Huỳnh Xuân Phong\*

Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học - Trường Đại học Cần Thơ

### TÓM TẮT

Nghiên cứu này được tiến hành nhằm phân lập các chủng vi khuẩn lactic và thử nghiệm ứng dụng trong sản xuất nem chua nấm rơm (*Volvariella volvacea*). Các chủng vi khuẩn lactic được phân lập, đánh giá khả năng lên men trên môi trường MRS lỏng và thử nghiệm khả năng lên men nem chua nấm rơm. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men được khảo sát với mật độ giống chủng ( $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^7$  tế bào/g) và nhiệt độ lên men ( $30^\circ\text{C}$ ,  $37^\circ\text{C}$  và nhiệt độ môi trường  $28-32^\circ\text{C}$ ). Kết quả đã phân lập được 20 chủng vi khuẩn lactic từ 6 mẫu nem chua. Các chủng vi khuẩn được xác định là Gram dương, hình que, không tạo bào tử và không có khả năng di động. Trong đó, 10 chủng có khả năng lên men tốt trên môi trường MRS lỏng có bổ sung D-glucose 20 g/L bao gồm TX61, HCGT31, HK162, L54, L7, HK221, L39, HCM2, TX3 và L30 với hàm lượng axit lactic sinh ra trong khoảng 10,5-21,0 g/L. Trên môi trường chứa nấm rơm, chủng HCM2 có khả năng sinh axit lactic cao nhất (đạt 14,3 g/L), được định danh là *Lactobacillus plantarum* và được chọn để ứng dụng trong lên men nem chua nấm rơm. Điều kiện lên men thích được xác định ở  $37^\circ\text{C}$  với mật độ  $10^7$  tế bào/g trong 24 giờ lên men.

**Từ khóa:** *Lactobacillus plantarum*, lên men axit lactic, nem chua nấm rơm, *Volvariella volvacea*

Ngày nhận bài: 16/11/2019; Ngày hoàn thiện: 20/12/2019; Ngày đăng: 10/01/2020

## ISOLATION AND SELECTION OF LACTIC ACID BACTERIA AND APPLICATION IN FERMENTATION OF MUSHROOM (*Volvariella volvacea*)

Truong Thi Thuy Nguyen, Le Thi Minh Thu, Tran Ngoc Han,  
Nguyen Thi My Tien, Mai Hoai Anh, Nguyen Ngoc Thanh,  
Bui Hoang Dang Long, Huynh Xuan Phong\*

Biotechnology Research and Development Institute - Can Tho University

### ABSTRACT

This study was conducted to isolate lactic acid bacterial strains and tested the production of fermented *Volvariella volvacea* mushroom. Lactic acid bacterial strains were isolated and tested for fermentation ability in MRS broth medium as well as screened for lactic acid fermentation of *V. volvacea* mushroom. Fermentation conditions were conducted with different initial cell concentrations ( $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^7$  cells/g) and fermentation temperatures ( $30^\circ\text{C}$ ,  $37^\circ\text{C}$  and environmental temperature  $28-32^\circ\text{C}$ ). As a result, 20 bacterial strains were isolated from 6 samples of *Nem chua* (Vietnamese fermented pork roll). These bacterial strains are Gram-positive, rod-shaped, non-spore-forming, and nonmobile. Among these bacterial strains, 10 strains had good fermentation ability in MRS broth supplemented with 20 g/L of D-glucose including TX61, HCGT31, HK162, L54, L7, HK221, L39, HCM2, TX3, and L30 with the lactic acid concentrations of 10.5-21.0 g/L. The HCM2 strain, identified as *Lactobacillus plantarum*, produced the highest lactic acid concentration (14.3 g/L) when fermented of *V. volvacea* mushroom. The suitable conditions for fermentation were determined at  $37^\circ\text{C}$  with the initial inoculum at  $10^7$  cells/g in 24 hours.

**Keywords:** *Lactobacillus plantarum*, lactic acid fermentation, mushroom fermentation, *Volvariella volvacea*

Received: 16/11/2019; Revised: 20/12/2019; Published: 10/01/2020

\* Corresponding author. Email: hxphong@ctu.edu.vn

## 1. Giới thiệu

Nem chua là một loại thực phẩm dinh dưỡng phổ biến ở các quốc gia Châu Á, đặc biệt là Việt Nam. Bản chất của lên men nem chua là một quá trình chuyển hóa đường thành axit lactic nhờ hoạt động của các vi khuẩn lactic bao gồm *Lactobacillus*, *Pediococcus* và *Micrococcus*, trong đó đóng vai trò quan trọng nhất là nhóm vi khuẩn *Lactobacillus* [1]. Dựa vào quá trình lên men axit lactic từ vi khuẩn có lợi với nhiều nguồn nguyên liệu, nem chua càng được nhiều người ưa thích hơn bởi sự thơm ngon và vị chua đặc trưng của sản phẩm.

Nấm rơm (*Volvariella volvacea*) là một loại nguyên liệu, thực phẩm rất phổ biến và rất được ưa chuộng trong khẩu phần ăn của người Việt. Năm 2017, cả nước trồng hơn 16 loại nấm với sản lượng đạt 115.000 tấn/năm, trong đó sản lượng nấm rơm là 64.500 tấn/năm, chiếm hơn 50% sản lượng nấm [2]. Với giá trị dinh dưỡng cao gồm 30% protein, 3% chất béo, 30% carbohydrate, 4% chất xơ, 338 Kcal/100 g trọng lượng khô, 206,27 mg vitamin C/g trọng lượng [3]. Ngoài ra, một số nghiên cứu khác cho thấy nấm rơm là một nguồn tiềm năng cung cấp prebiotic, có khả năng điều chỉnh hệ vi sinh vật đường ruột và cải thiện sức khỏe của con người.

Nguyên liệu chính sản xuất nem chua truyền thống là thịt và da heo, tuy nhiên trong thịt chứa lượng chất béo bão hòa cao không có lợi cho sức khỏe con người. Từ đó, việc sử dụng rau củ lên men sản xuất nem chua sẽ giải quyết kịp thời vấn đề này. Trong nấm rơm có nguồn đạm và axit amin cao hơn nhiều loài nấm khác [4]. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm sử dụng vi khuẩn lactic trong thử nghiệm lên men nem chua nấm rơm góp phần sử dụng nguồn nấm rơm dồi dào tại Việt Nam, góp phần tạo thu nhập cho các hộ dân trồng nấm, đa dạng hóa nguồn thực phẩm phục vụ cho sức khỏe con người.

## 2. Vật liệu và phương pháp

### 2.1. Nguyên vật liệu và hóa chất

Sáu mẫu nem chua dùng để phân lập vi khuẩn lactic được mua tại Đồng Tháp (ký hiệu: TX, HK), TP. Hồ Chí Minh (HCM, HCGT, HUE) và Thái Lan (THAI). Nấm rơm, gạo nếp và

các nguyên liệu khác (dầu thực vật, tỏi, đường, tiêu, muối) được mua tại chợ Hưng Lợi, Ninh Kiều, TP. Cần Thơ.

Mười chủng vi khuẩn lactic được lưu trữ ở phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học Thực phẩm, trường Đại học Cần Thơ (Huỳnh Nguyễn Như Thu, 2017) gồm: *Lactobacillus delbrueckii* L2; *L. plantarum* L7, L26, L30, L37, L52, L54; *L. casei* L9; *L. acidophilus* L11 và *L. rhamnosus* L39 [5].

Hóa chất sử dụng: Hóa chất nhuộm Gram, thuốc thử catalase  $H_2O_2$  3%, thuốc thử oxidase, malachite green (Nam Khoa Biotek), NaOH, ethanol 96% (Merck, Đức).

Môi trường MRS gồm có yeast extract 0,4%, beef extract 0,8%, peptone 1%, D-glucose 2%,  $K_2HPO_4$  0,2%,  $MgSO_4$  0,02%,  $MnSO_4$  0,004%, Tween 80 0,1%,  $C_2H_3NaO_2$  (sodium acetate) 0,5% (De Man, Rogosa, & Sharpe, 1960). Môi trường thử nghiệm: tỉ lệ nấm rơm và nếp đã nấu chín là 40:60, được phối trộn với 5% dầu thực vật, 8% tỏi băm nhuyễn, 1,5% đường, 1,5% tiêu xay, 1% muối. Tỷ lệ nguyên liệu dựa trên nghiên cứu của Chockchaisawasdee et al. về nghiên cứu phát triển xúc xích nấm bào ngư lên men [6].

### 2.2. Phân lập và xác định các đặc điểm của các chủng vi khuẩn từ các mẫu nem chua

Cân 10 g mỗi mẫu nem cho vào các bình tam giác chứa 90 ml môi trường MRS lỏng đã thanh trùng, ủ kỵ khí ở 37 °C trong 24 giờ để tăng sinh mẫu. Pha loãng và trải 0,1 mL mẫu ở nồng độ  $10^{-5}$  trong đĩa petri chứa MRS agar (bổ sung 0,5%  $CaCO_3$ ), ủ kỵ khí ở 37 °C trong 48 giờ. Chọn các khuẩn lạc làm tan  $CaCO_3$  để cấy truyền nhiều lần cho đến khi được đồng vi khuẩn thuần [7].

Xác định các đặc điểm hình thái và sinh hóa các chủng vi khuẩn phân lập: xác định hình dạng, khả năng di động, Gram và bào tử, hoạt tính catalase và oxidase [8].

### 2.3. Thử nghiệm khả năng lên men trên môi trường MRS lỏng bổ sung D-Glucose

Các chủng vi khuẩn lactic (các chủng vi khuẩn lactic phân lập và 10 chủng vi khuẩn lactic được lưu trữ) được tăng sinh trên môi trường MRS lỏng (pH 6,2) ở nhiệt độ 37 °C trong 24 giờ. Cấy mẫu tăng sinh trên môi trường MRS lỏng có bổ sung 20 g/L D-

glucose với tỉ lệ giống chủng 5% (w/v) và ủ ở 37 °C trong 72 giờ [9]. Phân tích chỉ tiêu axit lactic sau 72, 96 và 120 giờ bằng phương pháp xác định hàm lượng axit tổng.

#### 2.4. Tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic có khả năng lên men chua nấm rom

Môi trường thử nghiệm gồm nấm rom rửa sạch, cắt nhỏ, hấp ở 100 °C trong 20 phút, để nguội và ép loại bớt nước. Trộn với nếp đã được nấu chín (100 °C trong 45 phút và để nguội) cùng với nguyên liệu phụ. Chủng 0,4% (v/w) dịch tăng sinh của các chủng vi khuẩn vào môi trường thử nghiệm và trộn đều, ủ ở 37 °C trong 4 ngày. Xác định pH và hàm lượng axit sau 4 ngày lên men.

#### 2.5. Khảo sát ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn và nhiệt độ đến quá trình lên men

Thí nghiệm được thực hiện với 2 nhân tố: mật độ vi khuẩn ( $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^7$  tế bào/g) và nhiệt độ ủ (30 °C, 37 °C và nhiệt độ môi trường (28-32 °C)). Xác định pH và hàm lượng axit sau 12, 24, 36 và 48 giờ lên men.

#### 2.6. Định danh vi khuẩn có khả năng ứng dụng lên men chua nấm rom

Chủng vi khuẩn tuyển chọn được ly trích DNA và khuếch đại trình tự 16S ribosomal RNA bằng trình tự mồi 27F (5'-TACGGTTA CCTTGTTACGACT-3') và 1492R (5'-AGA GTTTGATCCTGGCTC-3') [10]. Kết quả giải trình tự được so sánh với trình tự vi khuẩn trên ngân hàng dữ liệu của NCBI bằng công cụ Nucleotide BLAST.

#### 2.7. Các phương pháp phân tích

Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm Statgraphics Centurion XVI (Statpoint Inc., USA) với phép thử Duncan ở độ tin cậy 95%.

Biểu đồ và các bảng số liệu được xây dựng bằng phần mềm Microsoft Excel 2010 (Microsoft Inc., USA). Axit tổng được xác định bằng phương pháp chuẩn độ axit [11].

### 3. Kết quả và thảo luận

#### 3.1. Kết quả phân lập và đặc điểm của các chủng vi khuẩn từ các mẫu nem chua

##### 3.1.1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào

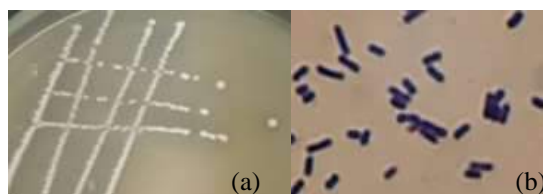
Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của 20 chủng vi khuẩn phân lập được trình bày ở Bảng 1. Một số đặc điểm chung về hình thái và sinh hóa sau 48 giờ nuôi cấy trên môi trường MRS được ghi nhận như sau: khuẩn lạc có màu trắng sữa hoặc trắng ngà, tròn, bóng, lồi, bìa nguyên.

##### 3.1.2. Đặc điểm sinh hóa

Tế bào của cả 20 chủng vi khuẩn lactic phân lập đều thuộc Gram dương do bắt màu xanh tím của thuốc nhuộm crystal violet (Hình 1). Không xảy ra hiện tượng hình thành bọt khí khi kiểm tra với  $H_2O_2$  3% nên các chủng vi khuẩn này không có enzyme catalase. Đa số không xuất hiện màu tím sẫm khi cho các chủng vi khuẩn lên giấy có thuốc thử tetramethyl-p-phenylendiamin dihydrochlorid 1% nên chúng không có thể hiện hoạt tính của enzyme oxidase. Chủng HK162, HK232 và HK221 có xuất hiện màu xanh trên mẫu giấy có tấm thuốc thử. Trên môi trường MRS agar bán lỏng (agar 0,5%), khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn không mọc lan, chứng tỏ chúng không có tính di động. Không bắt màu xanh với dung dịch thuốc nhuộm malachite green sau 2 tuần nuôi cấy trên ống thạch nghiêng, chứng tỏ các chủng vi khuẩn phân lập không có khả năng tạo nội bào tử.

**Bảng 1.** Hình thái khuẩn lạc và vi khuẩn lactic phân lập

Chủng vi khuẩn	Hình thái khuẩn lạc	Kích thước khuẩn lạc (mm)	Hình thái vi khuẩn
TX1, HUE12	Tròn, trắng ngà, bóng, lồi, bìa nguyên	1,5-2,0	que ngắn, kết đôi
TX21, TX61, THAI22	Tròn, trắng sữa, bóng, lồi, bìa nguyên	1,0-2,0	que ngắn, kết đôi
TX3, TX5, THAI33, HCGT31, HK162, HK22, HK232, THAI32	Tròn, trắng sữa, bóng, lồi, bìa nguyên	0,5-2,0	que ngắn, đơn
TX7, HUE21, THAI31, HCGT12	Tròn, trắng ngà, bóng, lồi, bìa nguyên	0,5-2,0	que ngắn, đơn
HUE11	Tròn, trắng sữa, bóng, phẳng, bìa nguyên	1,0-1,5	que ngắn, đơn
THAI82	Tròn, trắng sữa, bóng, phẳng, bìa nguyên	≤0,5	que ngắn, kết đôi
HCM2	Tròn, trắng sữa, lồi, bìa nguyên	0,5-1,0	que ngắn, đơn



**Hình 1.** Khuẩn lạc (a) và tế bào (b) chủng vi khuẩn HCM2 ở độ phóng đại X100

**Bảng 2.** Kết quả thử nghiệm sinh lý và sinh hóa của các chủng vi khuẩn phân lập

Tên chủng	Nhuộm Gram	Catalase	Oxidase	Tạo bào tử	Di động
TX1, TX21, TX3, TX5, TX61, TX7, HUE11, HUE12, HUE21, THAI22, THAI31, THAI32, THAI33, THAI82, HCM2, HCGT31, HCGT12, HK162, HK221, HK232	+	-	-	-	-
HK162, HK221, HK232	+	-	+	-	-

Các đặc điểm này cho thấy sự phù hợp với các đặc điểm điển hình của vi khuẩn lactic: khuẩn lạc có màu trắng sữa hoặc trắng ngà, tròn, bóng, lồi, bìa nguyên, tế bào có hình que ngắn, không di động, không tạo bào tử, Gram dương, catalase âm tính (Bảng 2). Kết quả này phù hợp với công bố của Marroki et al. khi phân lập 19 chủng vi khuẩn lactic trong sữa dê [12]. Kandler và Weiss xác định các chủng vi khuẩn lactic có các đặc điểm chung bao gồm: khuẩn lạc có bìa nguyên, mô, trơn, láng, bóng, tế bào có hình que thẳng hoặc cong, dài hoặc ngắn, không di chuyển, Gram dương, catalase âm tính, oxidase âm tính [13].

Nghiên cứu của Nguyễn Thị Lâm Đoàn et al. cho thấy hầu hết các vi khuẩn hiện diện trong nem chua là vi khuẩn lactic bao gồm Lactobacillus, Lactococcus, Vagococcus, Pediococcus, Leuconostoc và Weissella [14]. Do đó, có thể kết luận 20 chủng vi khuẩn phân lập đều thuộc nhóm vi khuẩn lactic.

### 3.2. Khả năng lên men trong môi trường MRS lỏng bổ sung D-glucose

Hàm lượng axit lactic của 30 chủng vi khuẩn đạt được trong khoảng 3,45-16,35 g/L (sau 72 giờ lên men), 4,58-21,0 g/L (sau 96 giờ lên men) và 3,53-16,88 g/L (sau 120 giờ lên men) (Bảng 3). Sau 96 giờ lên men, phần lớn hàm lượng axit sinh ra của các chủng vi khuẩn lactic là cao nhất và có hiện tượng giảm sau 120 giờ lên men. Axit lactic giảm có thể do một số loài vi khuẩn lactic có thể chuyển hóa

axit lactic trong điều kiện thiếu oxy với sự hiện diện của chất nhận điện tử thay thế như *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. brevis* [15].

Trong số 30 chủng vi khuẩn lactic, 10 chủng có hàm lượng axit sinh ra cao nhất sau 96 giờ lên men bao gồm HK221 (21,0 g/L), HCM2 (15,23 g/L), L7 (18,23 g/L), L39 (14,7 g/L), HK162 (13,35 g/L), TX61 (12,6 g/L), L30 (11,7 g/L), L54 (11,48 g/L), HCGT31 (11,1 g/L), TX3 (10,5 g/L) và có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê với mức ý nghĩa 5% so với các chủng còn lại. Trong đó, chủng HK221 có hàm lượng axit sau 96 giờ lên men đạt cao nhất (21,0 g/L), các chủng còn lại đều tạo axit với hàm lượng lớn hơn 11,0 g/L. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu trên 28 chủng vi khuẩn phân lập trong môi trường MRS lỏng với hàm lượng axit trong khoảng 8,0-29,0 g/L của Vũ Xuân Nam và Đỗ Tấn Thịnh [16]. Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thế Trang và Trần Đình Mẫn với chủng vi khuẩn lactic HN11 và HN34 cho hàm lượng axit lần lượt là 10,94 g/L và 12,76 g/L [17]. Chủng HK221 với hàm lượng axit đạt 21,0 g/L, cao hơn so với nghiên cứu của Nguyễn Thị Diễm Hương khi nuôi cấy chủng *L. fermentum* DC1 trong môi trường MRS lỏng bổ sung 20 g/L D-glucose trong 72 giờ ở 37 °C, lượng axit đạt 20,93 g/L [9]. Từ kết quả về hàm lượng axit lactic, 10 chủng vi khuẩn lactic có hàm lượng axit cao nhất sau 96 giờ lên men được tuyển chọn.

**Bảng 3.** Hàm lượng axit tổng số sinh ra theo thời gian của 30 chủng vi khuẩn lactic ở 37 °C

Chủng LAB	Axit lactic (g/L)			Chủng LAB	Axit lactic (g/L)		
	72 giờ	96 giờ	120 giờ		72 giờ	96 giờ	120 giờ
THAI22	4,5 <sup>r</sup>	7,13 <sup>n</sup>	6,6 <sup>o</sup>	HK221	16,35 <sup>a</sup>	21,0 <sup>a</sup>	16,88 <sup>a</sup>
THAI31	7,2 <sup>m</sup>	7,73 <sup>m</sup>	6,83 <sup>no</sup>	HCGT12	4,58 <sup>r</sup>	7,65 <sup>m</sup>	4,5 <sup>q</sup>
THAI32	8,18 <sup>kl</sup>	7,65 <sup>m</sup>	7,05 <sup>n</sup>	HCGT31	10,88 <sup>f</sup>	11,1 <sup>h</sup>	9,08 <sup>l</sup>
THAI33	5,63 <sup>q</sup>	6,38 <sup>o</sup>	6,83 <sup>no</sup>	HCM2	16,35 <sup>a</sup>	15,23 <sup>c</sup>	16,8 <sup>a</sup>
THAI82	10,5 <sup>gh</sup>	9,83 <sup>j</sup>	10,35 <sup>fg</sup>	L39	14,18 <sup>c</sup>	14,7 <sup>d</sup>	10,95 <sup>d</sup>
TX1	6,23 <sup>n</sup>	8,78 <sup>l</sup>	8,63 <sup>m</sup>	L37	9,08 <sup>j</sup>	9,23 <sup>kl</sup>	10,8 <sup>de</sup>
TX21	7,95 <sup>l</sup>	10,2 <sup>ij</sup>	10,2 <sup>ghi</sup>	L7	15,9 <sup>b</sup>	18,23 <sup>b</sup>	15,6 <sup>b</sup>
TX3	10,28 <sup>hi</sup>	10,5 <sup>i</sup>	9,83 <sup>ij</sup>	L54	10,73 <sup>fg</sup>	11,48 <sup>gh</sup>	10,43 <sup>efg</sup>
TX5	6,3 <sup>n</sup>	9,68 <sup>jk</sup>	8,48 <sup>m</sup>	L9	3,45 <sup>t</sup>	4,58 <sup>q</sup>	3,53 <sup>r</sup>
TX7	11,55 <sup>d</sup>	10,05 <sup>ij</sup>	9,83 <sup>ij</sup>	L30	10,13 <sup>i</sup>	11,7 <sup>g</sup>	10,28 <sup>fgh</sup>
TX61	11,18 <sup>e</sup>	12,6 <sup>f</sup>	9,3 <sup>kl</sup>	L11	10,13 <sup>i</sup>	10,13 <sup>ij</sup>	10,65 <sup>def</sup>
HUE12	5,7 <sup>pq</sup>	7,8 <sup>m</sup>	9,08 <sup>l</sup>	L26	8,25 <sup>k</sup>	10,43 <sup>i</sup>	9,9 <sup>hij</sup>
HUE21	4,05 <sup>s</sup>	5,33 <sup>p</sup>	5,03 <sup>p</sup>	L2	8,4 <sup>k</sup>	10,2 <sup>ij</sup>	10,88 <sup>d</sup>
HUE11	5,93 <sup>op</sup>	5,7 <sup>p</sup>	9,6 <sup>jk</sup>	L52	8,93 <sup>j</sup>	10,2 <sup>ij</sup>	9,0 <sup>l</sup>
HK162	15,98 <sup>b</sup>	13,35 <sup>e</sup>	14,7 <sup>c</sup>	HK221	16,35 <sup>a</sup>	21,0 <sup>a</sup>	16,88 <sup>a</sup>
HK232	6,08 <sup>no</sup>	7,58 <sup>mn</sup>	6,6 <sup>o</sup>	HCGT12	4,58 <sup>r</sup>	7,65 <sup>m</sup>	4,5 <sup>q</sup>

<sup>l</sup> Giá trị trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại, trong cùng một cột các chữ số mũ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê 5% ( $P < 0,05$ )

**Bảng 4.** Giá trị pH, hàm lượng axit lactic từ các chủng vi khuẩn sau 4 ngày lên men

Chủng LAB	Axit lactic (g/L)	pH trước lên men	pH sau lên men
TX61	8,1 <sup>e</sup>	7,01	4,78 <sup>a</sup>
HCGT31	9,9 <sup>c</sup>	6,98	4,51 <sup>b</sup>
HK162	12,0 <sup>b</sup>	6,96	4,25 <sup>cde</sup>
L54	9,9 <sup>c</sup>	6,99	4,45 <sup>bc</sup>
L7	12,3 <sup>b</sup>	6,99	4,22 <sup>de</sup>
HK221	11,7 <sup>b</sup>	6,97	4,19 <sup>de</sup>
L39	8,7 <sup>de</sup>	7,00	4,40 <sup>bcd</sup>
HCM2	14,3 <sup>a</sup>	6,96	4,16 <sup>e</sup>
TX3	9,5 <sup>cd</sup>	7,01	4,52 <sup>b</sup>
L30	11,9 <sup>b</sup>	6,98	4,20 <sup>de</sup>

<sup>l</sup> Giá trị trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại, trong cùng một cột các chữ số mũ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê 5% ( $P < 0,05$ )

### 3.3. Tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic có khả năng lên men nem chua nấm rơm

Mười chủng vi khuẩn lactic đều có khả năng lên men trên môi trường chứa nấm rơm thông qua việc sinh axit lactic và làm giảm pH của môi trường thử nghiệm. Kết quả ở Bảng 4 cho thấy hàm lượng axit lactic sau 4 ngày lên men của các chủng ở mức 8,1-14,3 g/L. Trong đó, chủng TX61 và L39 có hàm lượng axit lactic thấp nhất (8,1 g/L và 8,7 g/L) và khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với các chủng còn lại. Hàm lượng axit lactic của các chủng HK162, L7, HK221, HCM2 và L30 tương đối

cao (>11,0 g/L), đặc biệt chủng HCM2 có hàm lượng axit cao nhất (14,3 g/L) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng còn lại. Điều này có thể lý giải do nấm rơm có chứa 30% carbohydrate/100 g trọng lượng khô và khoáng chất [3]. Trong gạo nếp chứa 74,9% nguồn carbohydrate cùng với các chất khoáng đa lượng và vi lượng như canxi, phospho, sắt, natri. Đặc biệt vi khuẩn lactic sinh trưởng và phát triển rất nhanh trên môi trường có nhiều phức chất [18].

Giá trị pH trước lên men trên môi trường thử nghiệm trong khoảng 6,96-7,01. pH tối ưu cho sự phát triển của vi khuẩn lactic trong khoảng 5,5-6,5 [8]. Sau 4 ngày lên men, giá trị pH của 10 chủng vi khuẩn lactic ở mức 4,16-4,78. Chủng TX61 với pH ban đầu là 7,01 và sau 4 ngày lên men 4,78. Trong đó, chủng vi khuẩn HCM2 đạt giá trị pH thấp nhất (4,16) và khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với các chủng còn lại. Trong nghiên cứu của Doungkhwa et al., sau 3 ngày lên men ở 37°C với xúc xích thịt I-San (Thái Lan), mẫu có giá trị pH thấp nhất là 4,35 với hàm lượng axit lactic là 11,7 g/L [19]. Điều đó cho thấy khả năng lên men của chủng HCM2 trên môi trường thử nghiệm tốt hơn

với hàm lượng axit lactic sau 4 ngày lên men là 14,3 g/L và pH 4,16. Nghiên cứu của Casaburi et al. cho thấy với chủng *L. curvatus*, pH của xúc xích lên men Vallo di Diano giảm từ 6,3-5,05 sau 3 ngày lên men [20]. Kết quả cho thấy chủng HCM2 có khả năng sinh axit lactic cao hơn trên môi trường nem chua nấm rom với hàm lượng axit cao (14,3 g/L) và pH sau lên men thấp (4,16) so với các chủng được nghiên cứu.

### 3.4. Điều kiện thích hợp cho quá trình lên men nem chua nấm rom

Hàm lượng axit lactic sinh ra ở cả 3 mức nhiệt độ lên men (30 °C, 37 °C và nhiệt độ môi trường) đều tăng theo thời gian khi thử nghiệm lên men nem chua nấm rom với chủng HCM2 (Bảng 5). Trong 12 giờ đến 24 giờ đầu, hàm lượng axit lactic của các nhân tố tăng nhẹ. Cụ thể ở 37 °C, với mật độ  $10^7$  tế bào/g, hàm lượng axit sau 12 giờ là 6,6 g/L và sau 24 giờ là 7,5 g/L (tăng 0,9 g/L), sau đó hàm lượng axit lactic tăng mạnh từ 7,5-11,1 g/L sau 36 giờ (tăng 3,6 g/L) và từ 11,1-13,5 g/L (sau 48 giờ). Do trong 24 giờ đầu tiên, vi khuẩn chưa thích nghi và phát triển mật độ cao trong môi trường mới nên hàm lượng axit lactic sinh ra thấp. Giai đoạn từ 36 giờ đến 48 giờ, vi khuẩn đã thích nghi được với môi trường nem chua nấm rom và sinh ra nhiều

axit lactic khiến pH môi trường giảm mạnh. Cụ thể pH sau 48 giờ lên men của nhân tố có mật độ  $10^7$  tế bào/g giảm từ 4,76 xuống 3,89.

Ở cùng mật độ vi khuẩn sau 48 giờ lên men, hàm lượng axit lactic sinh ra giữa các mức nhiệt độ có sự khác biệt. Ở mật độ  $10^3$  tế bào/g, ở nhiệt độ môi trường (28-32 °C) hàm lượng axit lactic sau 48 giờ lên men là 8,4 g/L, ở mức nhiệt độ 30 °C là 8,7 g/L và ở 37 °C là 12,0 g/L. Nhìn chung, hàm lượng axit lactic của các nhân tố ở 37°C là cao nhất và khác biệt nhiều so với 2 mức nhiệt còn lại, hàm lượng axit lactic ở nhiệt độ 28-32 °C là thấp nhất và không chênh lệch nhiều so với nhiệt độ lên men ở 30 °C.

Ở mật độ  $10^7$  tế bào/g thì hàm lượng axit lactic ở nhiệt độ 28-32 °C và 30 °C sinh ra thấp, lần lượt là 8,7 g/L và 8,4 g/L, khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê. Ở nhiệt độ 37 °C, hàm lượng axit lactic sinh ra cao nhất (13,5 g/L) và khác biệt có ý nghĩa so với 2 mức nhiệt độ còn lại. Điều này có thể lý giải do ở 37 °C là nhiệt độ tối ưu cho quá trình sinh trưởng và lên men của vi khuẩn lactic nói chung. Nghiên cứu của Vũ Xuân Nam và Đỗ Tấn Thịnh cũng cho thấy 37 °C là nhiệt độ thích hợp cho việc sản sinh nhiều axit lactic (27,4-33,9 g/L) khi khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình sinh axit lactic của các chủng vi khuẩn lactic [16].

**Bảng 5.** Giá trị pH, hàm lượng axit lactic của chủng vi khuẩn HCM2 sau 48 giờ lên men trên môi trường thử nghiệm

Thử nghiệm		Hàm lượng axit lactic (g/L)				Giá trị pH			
Nhiệt độ	Mật độ	12 giờ	24 giờ	36 giờ	48 giờ	12 giờ	24 giờ	36 giờ	48 giờ
28-32°C	$10^3$	3,9 <sup>e</sup>	4,5 <sup>g</sup>	5,4 <sup>i</sup>	8,4 <sup>d</sup>	4,97 <sup>b</sup>	4,90 <sup>a</sup>	4,50 <sup>a</sup>	4,07 <sup>a</sup>
28-32°C	$10^5$	3,9 <sup>e</sup>	4,2 <sup>h</sup>	6,0 <sup>h</sup>	7,2 <sup>g</sup>	5,06 <sup>a</sup>	4,91 <sup>a</sup>	4,44 <sup>ab</sup>	4,00 <sup>ab</sup>
28-32°C	$10^7$	4,5 <sup>d</sup>	4,8 <sup>f</sup>	7,8 <sup>e</sup>	8,7 <sup>c</sup>	4,93 <sup>bc</sup>	4,87 <sup>a</sup>	4,39 <sup>b</sup>	3,97 <sup>b</sup>
30°C	$10^3$	6,0 <sup>c</sup>	6,0 <sup>e</sup>	9,0 <sup>d</sup>	8,7 <sup>c</sup>	4,89 <sup>c</sup>	4,72 <sup>b</sup>	4,39 <sup>b</sup>	4,03 <sup>ab</sup>
30°C	$10^5$	6,3 <sup>b</sup>	6,6 <sup>d</sup>	7,5 <sup>f</sup>	7,5 <sup>f</sup>	4,88 <sup>c</sup>	4,63 <sup>c</sup>	4,40 <sup>b</sup>	4,03 <sup>ab</sup>
30°C	$10^7$	6,0 <sup>c</sup>	6,9 <sup>c</sup>	6,9 <sup>g</sup>	8,1 <sup>e</sup>	4,87 <sup>c</sup>	4,59 <sup>cd</sup>	4,38 <sup>b</sup>	4,04 <sup>ab</sup>
37°C	$10^3$	6,0 <sup>c</sup>	6,9 <sup>c</sup>	10,2 <sup>c</sup>	12,0 <sup>b</sup>	4,69 <sup>e</sup>	4,55 <sup>d</sup>	4,28 <sup>c</sup>	3,78 <sup>d</sup>
37°C	$10^5$	6,3 <sup>b</sup>	7,2 <sup>b</sup>	10,5 <sup>b</sup>	12,0 <sup>b</sup>	4,78 <sup>d</sup>	4,53 <sup>d</sup>	4,22 <sup>c</sup>	3,87 <sup>c</sup>
37°C	$10^7$	6,6 <sup>a</sup>	7,5 <sup>a</sup>	11,1 <sup>a</sup>	13,5 <sup>a</sup>	4,76 <sup>de</sup>	4,53 <sup>d</sup>	4,23 <sup>c</sup>	3,89 <sup>c</sup>

<sup>1</sup> Giá trị trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại, trong cùng một cột các chữ số mũ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê 5% ( $P < 0,05$ )

Ở cùng một mức nhiệt độ, nhìn chung mật độ vi khuẩn cao thì hàm lượng axit sinh ra càng cao (Bảng 5). Quan sát về sự tác động của mật độ vi khuẩn đến quá trình lên men lactic thì ở nghiệm

thức trong giai đoạn 36 giờ đến 48 giờ lên men ở nhiệt độ 37 °C không có sự chênh lệch nhiều đối với mật độ  $10^3$  và  $10^5$  tế bào/g. Tuy nhiên, ở mật độ  $10^7$  tế bào/g, hàm lượng axit lactic sinh ra cao nhất (13,5 g/L) và khác biệt có ý nghĩa về mật độ thống kê so với 2 nghiệm thức còn lại.

Giá trị pH ở giai đoạn 24 giờ lên men, hàm lượng axit lactic sinh ra giữa các nghiệm thức là 4,2-7,5 g/L tương ứng với giá trị pH trong khoảng 4,53-4,90. Do từ 36 giờ đến 48 giờ, hàm lượng axit lactic sinh ra nhiều hơn nên pH môi trường giảm mạnh, điều này dẫn đến kết quả sản phẩm sau khi lên men quá chua. Mặt khác, sau 24 giờ lên men, giá trị pH phù hợp chỉ tiêu hóa lý về pH nem chua dựa theo TCVN 7050-2009 [21] với giá trị pH cho phép từ 4,5-5,4. Nghiên cứu của Chockchai-sawasdee cũng đã kết thúc quá trình lên men xúc xích nấm bào ngư khi pH đạt 5,0 [6]. Như vậy, chủng vi khuẩn HCM2 khi lên men nem chua nấm rơm ở 37 °C và mật độ  $10^7$  tế bào/g thì hàm lượng axit đạt cao nhất sau 48 giờ lên men là 13,5 g/L và thời gian thích hợp là 24 giờ, giá trị pH cuối ở mức 4,53.

#### 3.4. Định danh chủng vi khuẩn HCM2

Chủng HCM2 được giải trình tự gene bằng phản ứng PCR với cặp mồi 1492R và 27F [10] tại vùng gen 16S rRNA đạt 1.194 nucleotide. So sánh bằng dụng cụ Nucleotide BLAST tại <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> cho thấy trình tự của HCM2 tương đồng 99,33% với trình tự của *L. plantarum* WCFS1.

*Lactobacillus plantarum* là một trong những loài được nghiên cứu nhiều nhất trong ngành công nghiệp thực phẩm như probiotic và nguồn giống chủng trong công nghiệp lên men. Việc khai thác *L. plantarum* trong quá trình lên men thực phẩm là một lĩnh vực mới nổi và tạo ra các loại thực phẩm có giá trị gia tăng. *L. plantarum* cũng được sử dụng để sản xuất các loại đồ uống và thực phẩm chức năng mới với các tính năng công nghệ và dinh

dưỡng được cải thiện. *L. plantarum* được xác định từ nhiều loại thực phẩm truyền thống và đặc trưng cho hệ thống và phân loại phân tử, hệ thống enzyme ( $\alpha$ -amylase, esterase, lipase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase, enolase [22].

#### 4. Kết luận

Phân lập được 20 chủng vi khuẩn lactic từ 6 mẫu nem chua. Chủng HCM2 sinh axit lactic cao nhất (14,3 g/L), được định danh là *L. plantarum* và được chọn để ứng dụng trong lên men nem chua nấm rơm. Điều kiện thích hợp cho lên men nem chua nấm rơm của chủng *L. plantarum* HCM2 được xác định ở 37 °C với mật độ giống chủng ban đầu là  $10^7$  tế bào/g, hàm lượng axit lactic sau 48 giờ lên men là 13,5 g/L. Kết quả cho thấy tiềm năng phát triển sản phẩm nem chua từ nấm rơm.

**Lời cảm ơn:** Nhóm tác giả xin cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí của trường Đại học Cần Thơ thông qua đề tài nghiên cứu khoa học TSV2019-133.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1]. L. D. Nguyen, Traditional Fermented Foods. In: *Microbiology Technology (Vol. 3)*, Science and Technology Publishing House, Ho Chi Minh city, Vietnam, 2002 (In Vietnamese).
- [2]. V. T. T. Co, "Some typical results and research trends in edible and medicinal mushrooms in 2017-2020," (In Vietnamese), In: *Proceeding of The Annual Scientific Workshop of Agricultural Genetics Institute 2017*, Agricultural Genetics Institute, Vietnam, 2017.
- [3]. R. I. Torres-Lopez and P. R. Hepperly, *Nutritional influences on Volvariella volvacea (Bull. ex. Fr.) Sing, growth in Puerto Rico. I. Carbon and nitrogen*, Tropical Agriculture Research Station, 1988.
- [4]. D. H. Nguyen, *The Cultivation and Applications of Edible and Medicinal Mushrooms*, Nghe An Publishing House, Vietnam, 2003 (In Vietnamese).
- [5]. H. N. N. Thu, N. T. P. Dung, H. X. Phong, K. Sonomoto, T. Zendo and B. H. D. Long, "Selection of thermotolerant lactic acid bacteria producing high antibacterial activity and production of biomass from tofu sour liquid", *Can Tho University Journal of Science*, 7, pp. 51-57, 2017.

- [6]. S. Chockchaisawasdee<sup>1</sup>, S. Namjaidee<sup>1</sup>, Singdong Pochanal and C. E. Stathopoulos, "Development of fermented oyster-mushroom sausage", *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 3(1), pp. 35-43, 2010.
- [7]. N. Khunajakr, A. Wongwicharn, D. Moonmangmee and S. Tantipaiboonvut, "Screening and identification of lactic acid bacteria producing antimicrobial compounds from pig gastrointestinal tracts", *KMITL Sci. Tech. J.*, 8(1), pp. 8-17, 2008.
- [8]. Axelsson, *Lactic acid bacteria: Classification and Physiology*, Microbiological and Functional Aspects, 3rd Edition, Marcel Dekker, New York, pp. 1-66, 2004.
- [9]. H. D. T. Nguyen and T. B. T. Do, "Determination and investigation of some beneficial characteristics of *Lactobacillus fermentum* DC1 isolated from Hue pickles," (In Vietnamese), *Hue University Journal of Science*, 71(2), pp. 177-187, 2012.
- [10]. G. William, M. B. Susan, A. P. Dale and J. L. David, "16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study", *Journal of Bacteriology*, 173, pp. 697-703, 1991.
- [11]. M. T. Le, H. T. Nguyen, T. T. Pham, H. T. Nguyen and C. L. T. Le, *Analytical Methods in Fermentation Technology*, Science and Technology Publishing House, Vietnam, 2006 (In Vietnamese).
- [12]. A. Marroki, M. Zúñiga, M. Kihal and G. Pérez-Martínez, "Characterization of *Lactobacillus* from Algerian goat's milk based on phenotypic, 16S rDNA sequencing and their technological properties", *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(1), pp. 158-171, 2011.
- [13]. O. Kandler and N. Weiss, "*Genus Lactobacillus Beijerinck 1901, 212 AL*". In: P.H.A Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, J.G. Holt (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, Williams & Wilkins, pp. 1209-1234, 1986.
- [14]. D. L. T. Nguyen, V. H. Koenraad, C. Margo, B. T. Le and V. Peter, "Study of microbiomes in fermented meat (*nem chua*) by non-cultural methods," (In Vietnamese), *Journal of Science and Technology*, 50(2), pp. 157-168, 2015.
- [15]. S. J. W. H. O. Elferink, J. Krooneman, J. C. Gottschal, S. F. Spoelstra, F. Faber and F. Driehuis, "Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*," *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), pp. 125-132, 2001.
- [16]. N. X. Vu and T. T. Do, "Selection of lactic acid bacteria for lactic acid fermentation," (In Vietnamese), *Journal of Tropical Science and Technology*, 11, pp. 12, 2006.
- [17]. T. T. Nguyen and M. D. Tran, "Some typical characteristics of classification of L(+)-lactic acid producing bacterial strains HN11 and HN34 isolated in Vietnam," (In Vietnamese), *Journal of Biotechnology*, 6(4), pp. 505-511, 2008.
- [18]. M. Tokatl, G. Gülgör, S. B. Elmac, N. A. İşleyen and F. Özçelik, "In vitro properties of potential probiotic indigenous lactic acid bacteria originating from traditional pickles," *BioMed Research International*, 2, pp. 1-8, 2015.
- [19]. P. Doungkhwan, P. Tavitchasri, C. Laosinwattana, N. Ngamyeesoon and K. Pitasombut, "Comparison of fermentation process in Thai fermented pork sausage (I-San sausage) on quality and safety," *International Journal of Agricultural Technology*, 13(7), pp. 2205-2217, 2017.
- [20]. A. Casaburi, M. C. Aristoy, S. Cavella, R. D. Monaco, D. Ercolini, F. Toldra and F. Villani, "Biochemical and sensory characteristics of traditional fermented sausages of Vallo di Diano (Southern Italy) as affected by the use of starter cultures," *Meat Science*, 76(2), pp. 295-307, 2007.
- [21]. Vietnamese standard TCVN 7050:2009, *Meat and meat products processed without heat treatment - technical requirements*, 2009.
- [22]. S. S. Behera, R. C. Ray and N. Zdolec, "*Lactobacillus plantarum* with functional properties: An approach to increase safety and shelf-life of fermented foods," *Biomed Research International*, Article ID 9361614, pp. 1-18, 2018.