

DOI:10.22144/ctu.jvn.2020.154

## TUYỂN CHỌN VÀ ỨNG DỤNG ĐỒNG VI KHUẨN LACTIC LÊN MEN DƯA BỒN BỒN (*Typha orientalis*) MUỐI CHUA

Huỳnh Ngọc Thanh Tâm\*, Lê Quang Nghĩa, Nguyễn Trường Thành và Lê Thị Kim Đồng

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

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Huỳnh Ngọc Thanh Tâm (email: hnttam@ctu.edu.vn)

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 19/06/2020

Ngày nhận bài sửa: 20/08/2020

Ngày duyệt đăng: 28/12/2020

### Title:

Screening and application of lactic acid bacteria in the fermentation of *Typha orientalis*

### Từ khóa:

Bồn bồn, *Lactobacillus plantarum*, lên men, tối ưu hóa, vi khuẩn lactic

### Keywords:

Fermentation, lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum*, optimization, *Typha orientalis*

### ABSTRACT

The study was conducted to isolate, screen and identify lactic acid bacteria strains capable of producing high lactic acid content from plant *Typha orientalis* and find out the optimal treatment for high and effective fermentation. From samples collected in Ca Mau, the CMT2 strain with the highest acid content was selected from 21 lactic acid bacteria strains were isolated. Identification of bacteria by using the 16S rRNA method indicated that the bacteria strain CMT2 belonged to *Lactobacillus plantarum* that was registered on GenBank with code MN841920. After six days of fermentation, using Design Expert 7.0 software with Box Henken format, it was determined that the optimal treatment for the fermentation of *Typha orientalis* by CMT2 strain was pH 4.87, salt concentration of 4.08%, bacteria density of  $5.1 \times 10^8$  cell/mL with lactic acid content reached 5.71 g/L.

### TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập, tuyển chọn và định danh được đồng vi khuẩn lactic có khả năng sinh ra hàm lượng acid lactic cao từ cây bồn bồn (*Typha orientalis*), đồng thời ứng dụng lên men dưa bồn bồn và tìm ra nghiệm thức tối ưu cho quá trình lên men đạt hiệu quả cao. Từ nguồn mẫu bồn bồn được thu tại tỉnh Cà Mau, dòng CMT2 cho hàm lượng acid cao nhất được tuyển chọn trong 21 dòng vi khuẩn lactic được phân lập. Kết quả định danh bằng phương pháp 16S rRNA cho thấy dòng CMT2 tương đồng 99% với dòng *Lactobacillus plantarum* đã được đăng ký trên GenBank với mã số MN841920. Sau 6 ngày lên men dưa bồn bồn, thông qua phần mềm Design Expert 7.0 với mô hình Box-Behnken, đã xác định được nghiệm thức tối ưu cho quá trình lên men dưa bồn bồn là pH 4,87, nồng độ muối 4,08%, mật số vi khuẩn  $5,1 \times 10^8$  tế bào/mL với hàm lượng lactic acid đạt 5,71 g/L.

Trích dẫn: Huỳnh Ngọc Thanh Tâm, Lê Quang Nghĩa, Nguyễn Trường Thành và Lê Thị Kim Đồng, 2020. Tuyển chọn và ứng dụng đồng vi khuẩn lactic lên men dưa bồn bồn (*Typha orientalis*) muối chua. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56(6B): 153-163.

## 1 GIỚI THIỆU

Hiện nay, để đáp ứng nhu cầu của người tiêu dùng, các sản phẩm lên men đã và đang được nghiên

cứu rộng rãi nhằm cải tiến về chất lượng, năng suất cũng như quy mô sản xuất. Một trong những sản phẩm lên men phổ biến trên thế giới cũng như ở Việt Nam đó là rau củ muối chua, một loại thực phẩm

vừa cung cấp nhiều dinh dưỡng vừa giúp con người kéo dài thời gian bảo quản nguyên liệu (Behera *et al.*, 2020). Bón bón có tên khoa học là *Typha orientalis* còn gọi là cỏ nền, là loài cây rễ tiền và dễ tìm để làm rau củ muối chua, đã được người dân Nam Bộ biết đến như một loại rau dại và đã trở thành một thứ đặc sản của một số tỉnh như Cà Mau, Bạc Liêu. Không chỉ là một loại rau sạch, tốt cho sức khỏe bón bón còn được chế biến thành dưa bón bón, một loại dưa của người dân Nam Bộ nhưng lại trở thành một thứ đặc sản vùng miền và được nhiều người ưa chuộng. Vi khuẩn lactic (LAB – lactic acid bacteria) có ứng dụng khá rộng rãi trong thực tiễn và có ý nghĩa quan trọng trong nghiên cứu cũng như trong sản xuất thực phẩm, dược phẩm và công nghiệp hóa chất (Mazzoli *et al.*, 2014). Chúng là nhóm vi khuẩn được ứng dụng nhiều trong lên men các sản phẩm dưa muối chua, là nhóm vi khuẩn có lợi cho con người, giúp kích thích hoạt động hệ miễn dịch và cân bằng hệ vi sinh vật trong đường ruột có lợi cho sức khỏe (El Sheikha *et al.*, 2018; Kandasamy *et al.*, 2018). Bên cạnh đó, nhiều sản phẩm muối chua cũng là nguồn protein, carbohydrate, khoáng chất, vitamin và chất xơ quý giá (Mukisa *et al.*, 2017; Behera *et al.*, 2018; El Sheikha and Hu, 2020). LAB còn sinh các thành phần hương thơm, chất kháng khuẩn và khuẩn và exopolysaccharides (EPS) góp phần vào một số đặc điểm quan trọng, chẳng hạn như kết cấu, mùi vị và thời hạn sử dụng lâu hơn cho dưa chua lên men (Leroy and De Vuyst, 2004; Harutoshi, 2013; Suzuki *et al.*, 2013). Ngoài ra, LAB trong các sản phẩm ngâm chua có vai trò quan trọng trong việc giảm độc tố nấm mốc trong một số trường hợp nhất định, do đó làm giảm nhiều nguy cơ đối với sức khỏe. LAB được công nhận là GRAS (generally recognized as safe: được công nhận là an toàn) và rất hữu ích để chống lại sự phát triển liên tục của mầm bệnh và vi sinh vật gây hư hỏng trong các sản phẩm muối chua (Irkin and Songun, 2012; El Sheikha and Hu, 2020). Trên thế giới và Việt Nam đã có nhiều đề tài nghiên cứu ứng dụng các dòng vi khuẩn lactic trong lên men nhiều loại rau củ quả như: bắp cải, cải thảo, củ hành, tỏi, củ kiệu,... và nhiều loại rau củ khác (Lâm Thị Việt Hà và Nguyễn Văn Mười, 2006; Nguyễn Văn Mười và *ctv.*, 2013; Nguyễn Văn Mười và *ctv.*, 2014). Trên cơ sở đó, nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập, tuyển chọn, xác định khả năng sinh lactic acid của các dòng vi khuẩn lactic được phân lập từ cây bón bón nhằm chọn ra được dòng vi khuẩn có khả năng sinh acid lactic cao và ứng dụng chúng vào quá trình lên men dưa bón bón muối chua. Nghiên cứu cũng sẽ góp phần đa dạng hóa sản phẩm lên men, nâng cao

giá trị của nguồn đặc sản hiện có và phần nào đáp ứng nhu cầu sử dụng thực phẩm đa dạng của người dân Việt Nam hiện nay.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Vật liệu, hóa chất và môi trường

#### 2.1.1 Vật liệu

Mẫu cây bón bón (*Typha orientalis*) bao gồm rễ, lá, rễ được thu tại địa bàn thành phố Cà Mau và huyện Ngọc Hiển tỉnh Cà Mau.

#### 2.1.2 Hóa chất

Phenol đậm đặc, yeast extract, beef extract, peptone, glucose,  $K_2HPO_4$ ,  $C_6H_{14}N_2O_7$  (diammonium citrate),  $MnSO_4$ ,  $MgSO_4$ , Tween 80,  $C_2H_3NaO_2$  sodium acetate),  $CaCO_3$ ; Thuốc thử catalase  $H_2O_2$  3%, thuốc thử oxidase (sản phẩm của Công ty Nam Khoa Biotek), thuốc thử Kovac's, NaOH 0,1N, phenolphthalein, cồn (70% và 96%); Hóa chất nhuộm gram: crystal violet, dung dịch lugol, dung dịch khử màu (ethanol và acetone theo tỉ lệ 1:1), safranin..

2.1.3 Môi trường: MRS agar (De Man, Rogosa và Sharpe, Merck, Đức), môi trường MRS broth (Merck, Đức), môi trường LB (Nutrient Broth, Himedia - M002 - 500 g)

### 2.2 Phân lập và định danh sơ bộ các dòng vi khuẩn lactic từ cây bón bón

Mẫu bón bón sau khi thu về được xử lý sơ bộ để loại bỏ các tạp chất sau đó chia mẫu thành 2 phần (phần 1: rễ và lá ở phía trên mặt nước; phần 2: rễ và lá ở phía dưới mặt nước) và xay nhuyễn. Sau đó, lấy 10 mL dịch mẫu cho vào 90 mL môi trường MRS lỏng và đem lắc ủ ở 37°C trong 48 giờ. Sau khi ủ, lấy 0,1 mL các dung dịch mẫu tiến hành cấy trải trên đĩa chứa môi trường thạch MRS và tiếp tục ủ ở 37°C. Sau 48 giờ, quan sát và chọn những khuẩn lạc đặc trưng xuất hiện và tiến hành cấy chuyển sang đĩa môi trường mới. Thực hiện việc cấy chuyển nhiều lần cho đến khi độ thuần của dòng vi khuẩn được xác định (Huỳnh Ngọc Thanh Tâm và *ctv.*, 2019). Những dòng vi khuẩn được chấp nhận khi có hình dạng khuẩn lạc trắng đục, hoặc trắng sữa, mô nổi hoặc lồi, bìa nguyên hoặc chia thùy. Khuẩn lạc phân lập nằm trên đường cấy chuyển và không lẫn với những khuẩn lạc có hình thái và màu sắc lạ. Sau khi được phân lập, các dòng vi khuẩn sẽ được kiểm tra hình thái và quan sát độ thuần dưới kính hiển vi bằng cách hòa khuẩn lạc của dòng vi khuẩn cần quan sát vào nước cất vô trùng, đặt trên miếng lam đã khử trùng bằng cồn 96°, thực hiện quan sát mẫu dưới kính hiển vi (Olympus BX41, Nhật) với vật kính

40X và 100X. Khi phân lập được dòng thuần từ nguồn mẫu, vi khuẩn lactic được xác định bằng các thí nghiệm sinh hóa được tiến hành như mô tả của Hammes and Hertel (2009): nhuộm Gram, thử nghiệm catalase và oxydase; nhuộm bào tử, kiểm tra khả năng sinh lactic acid để xác định vi khuẩn lactic.

**2.3 Tuyển chọn dòng vi khuẩn lactic có khả năng sinh acid lactic cao**

Chuẩn bị 10 mL môi trường sữa tươi vô trùng có bổ sung đường sucrose 4% (w/v) và 10 mL sữa tươi vô trùng không có bổ sung sucrose cho vào mỗi ống nghiệm. Nuôi cấy các dòng vi khuẩn lactic trong ống nghiệm chứa 10 mL môi trường MRS trong 48 giờ, ủ lactic ở 37°C. Cấy giống vi khuẩn lactic vào môi trường sữa tươi vô trùng đã chuẩn bị (với 10% thể tích môi trường), để yên và ủ 24 giờ ở nhiệt độ 37°C. Phân tích hàm lượng acid tổng số sau 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ thông qua việc xác định và đánh giá khả năng sinh acid lactic của các dòng LAB bằng phương pháp chuẩn độ acid. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại (Huỳnh Ngọc Thanh Tâm và ctv., 2020).

Định lượng khả năng sinh acid lactic sử dụng phương pháp chuẩn độ Therner bằng NaOH theo mô tả của Nguyễn Thị Minh Hằng và Nguyễn Thị Minh Thư (2013). Sau khi thu 2 mL dung dịch vi khuẩn trong môi trường sữa tươi cho vào bình tam giác, nhỏ tiếp 1 – 2 giọt phenolphthalein vào mỗi bình tam giác chứa dung dịch vi khuẩn và tiến hành chuẩn độ bằng cách cho mỗi lần 20 µL NaOH 0,1 N đã chuẩn bị, đếm số lần cho vào đến khi mẫu trong bình tam giác chuyển sang màu hồng nhạt và bền màu trong 30 giây. Từ số lần nhỏ NaOH xác định được thể tích NaOH 0,1 N cần dùng.

Công thức tính hàm lượng acid lactic trong 2 mL dịch mẫu:  $A = (0,009 \times n \times 1000) / 2$  (g/L)

Trong đó: A là hàm lượng acid trong 2 mL mẫu (g/L); n là số mL NaOH 0,1 N dùng để chuẩn độ; và 0,009 là hệ số K của acid lactic.

**2.4 Định danh dòng vi khuẩn acid lactic có khả năng sinh acid lactic cao bằng kỹ thuật sinh học phân tử kết hợp đặc điểm hình thái và sinh hóa**

Dòng vi khuẩn lactic có khả năng lên men acid lactic cao được chọn để định danh đến mức độ loài bằng phương pháp sinh học phân tử, kết hợp với đặc điểm hình thái và thí nghiệm sinh hóa.

Thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi được thiết kế theo (Weisburg *et al.*, 1991) với trình tự cặp mồi là:

1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACT-3')

27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3').

Sản phẩm PCR sau khi được khuếch đại sẽ được giải trình tự tại Công ty Phù Sa (Cần Thơ, Việt Nam) và sử dụng chương trình Nucleotide Blast để so sánh mức độ tương đồng của trình tự gen 16S được giải với trình tự của các dòng vi khuẩn lactic có trong ngân hàng gen trên National Center for Biotechnology Information (NCBI).

**2.5 Khảo sát ảnh hưởng của pH, nồng độ muối và mật số vi khuẩn đến quá trình lên men dưa bòn bòn**

Khảo sát sự ảnh hưởng của pH, nồng độ muối của dung dịch ban đầu và mật số vi khuẩn đến quá trình lên men dưa bòn bòn, từ đó chọn ra được các thông số thích hợp để quá trình lên men dưa bòn bòn đạt hiệu quả cao. Thí nghiệm với 2 lần lặp lại. Thí nghiệm được bố trí theo mô hình Box Behnken của phần mềm Design Expert 7.0 với ba nhân tố ảnh hưởng đến quá trình lên men dưa bòn:

- Nhân tố A: nồng độ muối, giá trị nhỏ nhất (min) 3,5% và giá trị lớn nhất (max) 4,5%.
- Nhân tố B: pH, giá trị nhỏ nhất (min) 4,5 và giá trị lớn nhất (max) 6,5.
- Nhân tố C: mật số vi khuẩn (tế bào/mL), giá trị nhỏ nhất (min) 10<sup>5</sup> và giá trị lớn nhất (max) 10<sup>9</sup>.

**Bảng 1: Các nghiệm thức theo bố trí của thể thức Box–Behnken, phần mềm Design Expert 7.0**

Nghiệm thức	pH	Nồng độ muối (%)	Mật số LAB (tế bào/mL)
1	4,5	3,5	5 x 10 <sup>8</sup>
2	6,5	3,5	5 x 10 <sup>8</sup>
3	4,5	4,5	5 x 10 <sup>8</sup>
4	6,5	4,5	5 x 10 <sup>8</sup>
5	4,5	4,0	10 <sup>5</sup>
6	6,5	4,0	10 <sup>5</sup>
7	4,5	4,0	10 <sup>9</sup>
8	6,5	4,0	10 <sup>9</sup>
9	3,5	3,5	10 <sup>5</sup>
10	5,5	4,5	10 <sup>5</sup>
11	5,5	3,5	10 <sup>9</sup>
12	5,5	4,5	10 <sup>9</sup>
13	5,5	4,0	5 x 10 <sup>8</sup>
14	5,5	4,0	5 x 10 <sup>8</sup>
15	5,5	4,0	5 x 10 <sup>8</sup>

Chuẩn bị vi khuẩn giống: sử dụng dòng vi khuẩn đã được tuyển chọn có khả năng sinh acid lactic cao nhất. Bòn bòn sau khi đã xử lý sơ bộ (rửa sạch, cắt

đoạn 3-4cm, xếp vào bình lên men, 100 g bông bông/100 mL dung dịch ngâm) sẽ cho vào môi trường điều được chỉnh lần lượt về nồng độ muối, pH, mật số vi khuẩn dựa theo bố trí thí nghiệm của phần mềm Design Expert 7.0. Cho 100 mL dung dịch vào bình lên men, sau đó chủng vi khuẩn với mật số dựa theo bố trí thí nghiệm của Bảng 1, lên men 6 ngày ở nhiệt độ phòng. Khi quá trình lên men kết thúc tiến hành phân tích mẫu.

*Chỉ tiêu đánh giá:* pH sau lên men; hàm lượng acid toàn phần, tính theo acid lactic (%).

### 2.6 Xử lý thống kê

Số liệu được thu thập, xử lý và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Microsoft Excel 2013. Bố trí thí nghiệm và xác định các thông số tối ưu theo phần mềm Design Expert 7.0. Phần mềm Statgraphics Centurion XV.I được sử dụng để phân tích thống kê và kiểm định LSD các trung bình nghiệm thức ở mức ý nghĩa 5%.

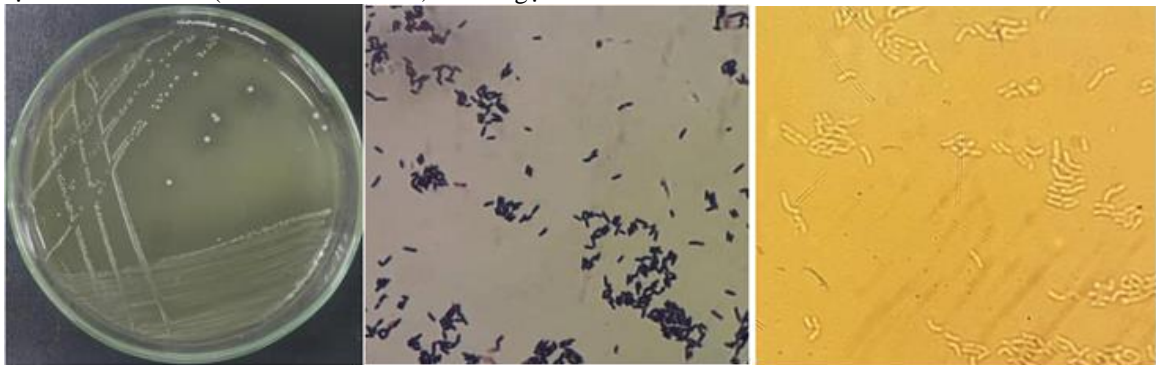
## 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Phân lập và định danh sơ bộ các dòng vi khuẩn lactic từ cây bông bông

Qua quá trình phân lập thu được 24 dòng LAB trên môi trường MRS từ các bộ phận của cây bông bông (*Typha orientalis*) thu tại huyện Ngọc Hiển và thành phố Cà Mau, tỉnh Cà Mau. Kí hiệu của dòng vi khuẩn được bắt đầu bằng 2 chữ cái viết hoa là tên địa điểm thu mẫu (CM: TP. Cà Mau; NH: Ngọc

Hiển), chữ cái viết hoa thứ 3 là bộ phận lấy mẫu của cây bông bông (T: lá bẹ trên mặt nước; D: bẹ và rễ dưới mặt nước). Có 13 dòng trong 24 dòng vi khuẩn được phân lập tại thành phố Cà Mau, chiếm 54,2% tổng số dòng vi khuẩn phân lập được (6 dòng phân lập được từ các bộ phận như lá và bẹ của cây bông bông ở phía trên mặt nước, chiếm 46,2% và 7 dòng phân lập được từ các bộ phận như rễ và bẹ của cây bông bông ở phía dưới mặt nước, chiếm 53,8%) và 11 dòng vi khuẩn được phân lập tại huyện Ngọc Hiển, chiếm 45,8% (6 dòng vi khuẩn được phân lập từ lá và bẹ của cây bông bông ở phía trên mặt nước, chiếm 54,55% và 5 dòng được phân lập từ bẹ và rễ của cây bông bông ở phía dưới mặt nước, chiếm 45,45%).

Khuẩn lạc của 24 dòng vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường MRS sau 48 giờ ở 37°C có một số đặc điểm giống và khác nhau. Hầu hết khuẩn lạc có dạng hình tròn, bìa nguyên, bóng, nổi mô hoặc lồi và có tâm ở giữa, màu sắc cũng có sự khác biệt giữa các dòng như màu trắng đục và trắng sữa. Kích thước khuẩn lạc tương đối nhỏ dao động từ 1 mm đến 2 mm. Trong đó, 10 dòng vi khuẩn có khuẩn lạc dạng hình tròn, bìa nguyên, nổi mô cao, trắng sữa chiếm 41,7%, 6 dòng vi khuẩn có khuẩn lạc dạng hình tròn, bìa nguyên, nổi mô, trắng đục, chiếm 25%, 2 dòng vi khuẩn có khuẩn lạc dạng hình tròn bìa nguyên, mô lồi, trắng sữa chiếm 8,3% và 6 dòng vi khuẩn có dạng khuẩn lạc hình tròn, bìa nguyên, mô lồi, trắng đục chiếm 25%.



Dòng CMT2

(a)

Dòng NHT2

(b)

Dòng CMD5 (Gram dương)

(c)

**Hình 1: Hình dạng khuẩn lạc (a), tế bào (b) và nhuộm Gram của các dòng vi khuẩn dưới kính hiển vi có độ phóng đại 100X**

Quan sát các dòng vi khuẩn phân lập được dưới kính hiển vi (Olympus BX41, Nhật) ở vật kính 100X, kết quả cho thấy phần lớn tế bào của các dòng vi khuẩn phân lập được từ cây bông bông phần lớn có

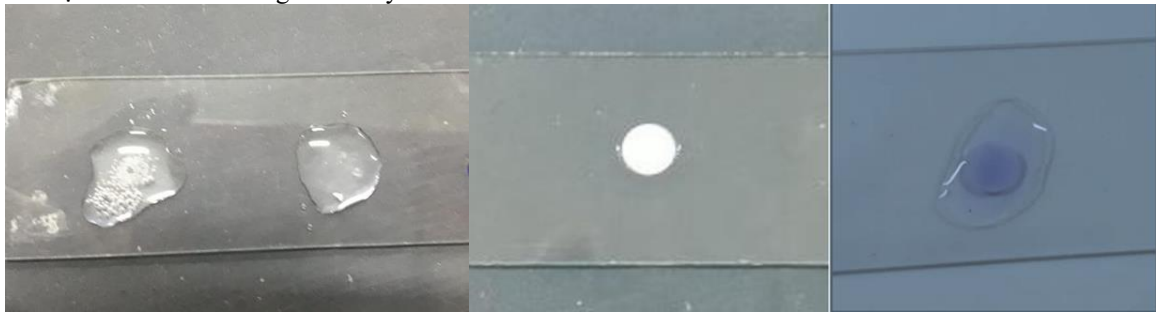
hình que ngắn cụ thể có 7/24 dòng vi khuẩn có tế bào dạng que dài, chiếm 29,2%; 3/24 dòng vi khuẩn có tế bào dạng hình cầu, chiếm 12,5% và 14/24 dòng vi khuẩn có tế bào dạng que ngắn, chiếm 58,3%. Sau



đó, tiến hành một số thử nghiệm đặc trưng bao gồm nhuộm Gram, thử nghiệm catalase và oxidase, đồng thời kiểm tra khả năng sinh acid lactic nhằm xác định đặc tính sinh lý và sinh hóa của các dòng vi khuẩn phân lập được. Sau khi xác định hình thái khuẩn lạc, hình dạng tế bào của các dòng vi khuẩn phân lập được ta tiến hành nhuộm Gram đối với các tế bào còn non (trong khoảng 24 giờ nuôi cấy). Kết quả nhuộm Gram cho thấy tất cả các dòng vi khuẩn đều bắt màu xanh tím (Gram dương). Các đặc điểm khuẩn lạc, tế bào và sinh hóa của một số dòng vi khuẩn phân lập được thể hiện ở Hình 1 và Hình 2.

Hai mươi bốn (24) dòng vi khuẩn Gram dương sẽ được kiểm tra khả năng sinh enzyme catalase và

cytochrome oxidase. Kiểm tra sự xuất hiện của enzyme catalase bằng  $H_2O_2$  3%. Kết quả cho thấy 21 dòng âm tính catalase, không có hiện tượng sủi bọt khí chiếm 87,5%, chứng tỏ các dòng này không có enzyme catalase. Trong khi đó 3 dòng có hiện tượng sủi bọt, dương tính catalase chiếm 12,5%, điều này chứng tỏ các dòng này có enzyme catalase, phân giải  $H_2O_2$  thành  $O_2$  và  $H_2O$ . Các dòng vi khuẩn cho kết quả âm tính với catalase được tiến hành thử nghiệm oxydase bằng giấy lọc tẩm thuốc thử. Kết quả 21 dòng đều không làm đổi màu giấy thử, cho thấy 100% dòng vi khuẩn không có khả năng sinh enzyme cytochrome oxydase.



(a) (b) (c) (d)

**Hình 2: Thử nghiệm khả năng sinh enzyme catalase (a, b) và enzyme oxidase (c, d)**

(a: kết quả dương tính khả năng sinh catalase (dòng CMT5); b: kết quả âm tính thử nghiệm sinh catalase (dòng CMT5); c: kết quả âm tính thử nghiệm sinh oxidase (dòng CMT2); kết quả dương tính thử nghiệm sinh oxidase (dòng đối chứng)

Thông qua các đặc điểm sinh lý, sinh hóa của các dòng vi khuẩn phân lập được, chọn được 21 dòng vi khuẩn để tiến hành kiểm tra khả năng sinh acid lactic. Điều kiện tiên quyết để khẳng định là vi khuẩn lactic là chúng phải có khả năng sinh ra acid lactic. Do đó, dịch tăng sinh của 21 dòng vi khuẩn Gram dương, không có khả năng sinh enzyme oxidase và enzyme catalase được thử với Uffelmann để kiểm tra khả năng sinh acid lactic, HCl được chọn làm đối chứng dương. Tất cả 21/21 dòng vi khuẩn làm đổi màu dung dịch thuốc thử từ màu tím sang màu vàng, chứng tỏ những dòng này có khả năng sinh acid lactic.

Theo mô tả hình thái, phân loại sơ bộ về các dòng LAB (Lương Đức Phẩm, 2006), giống vi khuẩn acid lactic là các vi khuẩn Gram dương, chịu acid, không hình thành bào tử, di động hoặc không di động, có tế bào hình que hoặc hình cầu, sinh sản bằng cách nhân đôi, không sinh indole, catalase và oxidase âm tính, phân giải được  $CaCO_3$ . Kết hợp

giữa đặc điểm hình thái và đặc điểm sinh hóa, có thể kết luận 21 dòng vi khuẩn phân lập từ cây bòn bòn thuộc vi khuẩn lactic. Kết này phù hợp với kết quả đã được công bố của Arimah *et al.* (2014), Đỗ Thị Tuyết Nhung và *ctv.* (2014); Huỳnh Ngọc Thanh Tâm và *ctv.* (2020). Do đó 21 dòng này được sử dụng cho thí nghiệm tuyển chọn dòng vi khuẩn có khả năng sinh acid lactic cao trong phần tiếp theo.

### 3.2 Tuyển chọn dòng vi khuẩn lactic có khả năng sinh acid lactic cao

Đánh giá khả năng sinh acid lactic của các dòng vi khuẩn bằng cách nuôi tăng sinh trong môi trường sữa ở nhiệt độ 37°C. Tổng cộng có 42 nghiệm thức bao gồm 21 nghiệm thức của môi trường sữa bổ sung 0% sucrose và 21 nghiệm thức của môi trường sữa bổ sung 4% sucrose. Mỗi nghiệm thức có 3 lần lặp lại. Theo dõi và phân tích hàm lượng acid lactic tổng số sinh ra ở 3 mốc thời gian là 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ. Kết quả thu được ở Bảng 2.

**Bảng 2: Hàm lượng acid lactic tổng số (g/L) sinh ra ở các mốc thời gian 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ của 21 dòng LAB**

STT	Dòng LAB	Không bổ sung sucrose			Bổ sung 4% sucrose		
		24 giờ	48 giờ	72 giờ	24 giờ	48 giờ	72 giờ
1	CMT1	8,37 <sup>de</sup>	10,08 <sup>d</sup>	13,05 <sup>d</sup>	10,08 <sup>d</sup>	11,34 <sup>d</sup>	13,50 <sup>d</sup>
2	CMT2	13,41 <sup>a</sup>	15,75 <sup>a</sup>	16,95 <sup>a</sup>	15,21 <sup>a</sup>	15,84 <sup>a</sup>	17,28 <sup>a</sup>
3	CMT3	7,41 <sup>fg</sup>	8,55 <sup>fgh</sup>	9,81 <sup>fg</sup>	8,31 <sup>ijk</sup>	9,00 <sup>hi</sup>	9,99 <sup>ij</sup>
4	CMT4	8,19 <sup>e</sup>	9,15 <sup>e</sup>	9,72 <sup>g</sup>	9,06 <sup>efg</sup>	9,39 <sup>gh</sup>	10,08 <sup>hij</sup>
5	CMD1	7,35 <sup>fg</sup>	8,28 <sup>hi</sup>	11,70 <sup>e</sup>	7,50 <sup>m</sup>	10,17 <sup>f</sup>	11,97 <sup>f</sup>
6	CMD2	7,44 <sup>f</sup>	7,56 <sup>j</sup>	8,19 <sup>jk</sup>	8,97 <sup>fgh</sup>	10,26 <sup>f</sup>	11,07 <sup>g</sup>
7	CMD3	8,73 <sup>d</sup>	10,08 <sup>d</sup>	12,15 <sup>e</sup>	9,15 <sup>ef</sup>	10,74 <sup>e</sup>	12,42 <sup>ef</sup>
8	CMD4	8,16 <sup>e</sup>	8,82 <sup>efg</sup>	9,57 <sup>gh</sup>	7,80 <sup>lm</sup>	8,58 <sup>ij</sup>	9,63 <sup>j</sup>
9	CMD5	7,35 <sup>fg</sup>	7,65 <sup>i</sup>	7,95 <sup>k</sup>	7,50 <sup>m</sup>	9,18 <sup>gh</sup>	12,51 <sup>e</sup>
10	CMD6	9,21 <sup>c</sup>	11,52 <sup>c</sup>	11,70 <sup>e</sup>	14,67 <sup>b</sup>	14,76 <sup>b</sup>	15,75 <sup>c</sup>
11	NHT1	8,37 <sup>de</sup>	8,64 <sup>fgh</sup>	8,82 <sup>i</sup>	8,64 <sup>ghijk</sup>	9,03 <sup>hi</sup>	9,99 <sup>ij</sup>
12	NHT2	9,78 <sup>b</sup>	13,59 <sup>b</sup>	16,29 <sup>b</sup>	11,76 <sup>c</sup>	14,58 <sup>b</sup>	16,47 <sup>b</sup>
13	NHT3	8,04 <sup>e</sup>	8,46 <sup>gh</sup>	9,99 <sup>fg</sup>	8,22 <sup>kl</sup>	9,18 <sup>gh</sup>	11,97 <sup>f</sup>
14	NHT4	8,13 <sup>e</sup>	11,25 <sup>c</sup>	13,68 <sup>c</sup>	9,45 <sup>e</sup>	11,34 <sup>d</sup>	13,86 <sup>d</sup>
15	NHT5	8,07 <sup>e</sup>	11,58 <sup>c</sup>	13,17 <sup>cd</sup>	8,67 <sup>ghijk</sup>	13,02 <sup>c</sup>	15,48 <sup>c</sup>
16	NHT6	8,10 <sup>e</sup>	8,37 <sup>ghi</sup>	8,91 <sup>i</sup>	7,35 <sup>m</sup>	7,80 <sup>k</sup>	8,28 <sup>k</sup>
17	NHD1	6,36 <sup>i</sup>	7,89 <sup>ij</sup>	8,55 <sup>ji</sup>	8,49 <sup>ijk</sup>	8,67 <sup>ij</sup>	9,72 <sup>ij</sup>
18	NHD2	7,02 <sup>gh</sup>	8,40 <sup>gh</sup>	9,81 <sup>fg</sup>	8,28 <sup>jk</sup>	8,46 <sup>j</sup>	10,20 <sup>hi</sup>
19	NHD3	7,20 <sup>fg</sup>	9,27 <sup>e</sup>	10,38 <sup>f</sup>	8,58 <sup>hijk</sup>	9,63 <sup>g</sup>	10,56 <sup>gh</sup>
20	NHD4	6,66 <sup>hi</sup>	9,00 <sup>ef</sup>	9,90 <sup>fg</sup>	8,73 <sup>fghij</sup>	9,18 <sup>gh</sup>	10,08 <sup>hij</sup>
21	NHD5	7,08 <sup>fg</sup>	8,19 <sup>hi</sup>	9,03 <sup>hi</sup>	8,76 <sup>fghi</sup>	9,00 <sup>hi</sup>	9,90 <sup>ij</sup>

Ghi chú: Giá trị trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị trung bình trong cùng một cột theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 5% theo phần mềm thống kê STATGRAPHICS.

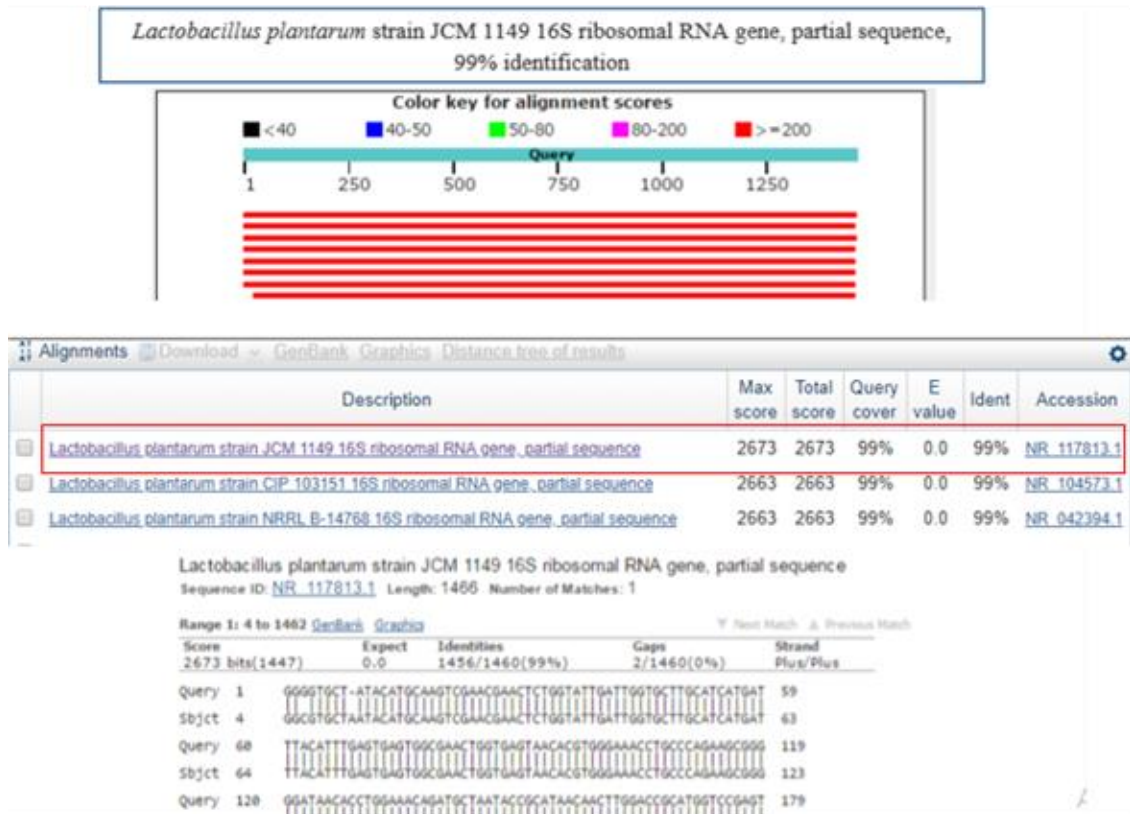
Kết quả cho thấy 21 dòng LAB đều có khả năng sinh acid lactic sau 24 giờ đến 72 giờ cả trong môi trường không bổ sung sucrose và bổ sung 4% sucrose. Trong môi trường sữa, các dòng LAB đã chuyển hóa nguồn đường lactose và sucrose có trong sữa thành acid lactic. Đường lactose trong sữa được thủy phân thành 2 đường đơn là glucose và galactose, đường sucrose thành glucose và fructose. LAB chuyển hóa các loại đường này theo chu trình EMP (Embden-Mayerhoff-Parnas) tạo thành acid pyruvic, acid pyruvic tiếp tục chuyển thành acid lactic (Lương Đức Phẩm, 2006).

Qua kết quả cho thấy có sự gia tăng đáng kể hàm lượng acid tổng số qua 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ. Tất cả các dòng LAB phân lập được đều sinh ra hàm lượng acid tổng số cao nhất sau 72 giờ. Dòng CMT2 cho hàm lượng acid tổng số cao nhất sau 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ so với tất cả các dòng còn lại: ở môi trường không bổ sung sucrose là 13,41 g/L (24 giờ); 15,75 g/L (48 giờ); 16,95 g/L (72 giờ); ở môi trường có bổ sung 4% sucrose là 15,21 g/L (24 giờ); 15,84 g/L (48 giờ); 17,28 g/L (72 giờ). Qua kết quả cho thấy có sự gia tăng đáng kể hàm lượng acid tổng số qua 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ. Tất cả các dòng LAB phân lập được đều có hàm lượng acid tổng số cao

nhất sau 72 giờ. Nhìn chung, lượng acid sinh ra nhiều hơn khi bổ sung 4% sucrose vào môi trường nuôi cấy. Kết quả phù hợp với nghiên cứu của Huỳnh Ngọc Thanh Tâm và *ctv.* (2020). Nguyên nhân hàm lượng acid tăng theo thời gian do sau 24 giờ số lượng vi khuẩn tăng sinh chưa đủ nên hàm lượng acid lactic sinh ra ít, sau 48 giờ và 72 giờ số lượng vi khuẩn tăng lên nhiều hơn, do đó lượng acid sinh ra cao hơn. Yếu tố thời gian nuôi cấy sẽ có ảnh hưởng đến việc tăng số lượng tế bào vi khuẩn. Để chuyển hóa được hết nguồn dinh dưỡng thành acid lactic vi khuẩn cần phải có thời gian nhất định và đủ lượng vi khuẩn nhưng khoảng thời gian này quá dài sẽ tác động ngược lại làm giảm số lượng vi khuẩn và lượng acid sinh ra (Nguyễn Lâm Dũng và *ctv.*, 1976). Từ kết quả trên, dòng CMT2 được chọn để định danh ở mức độ loài và thực hiện thí nghiệm tối ưu hóa lên men dựa bồn bồn.

### 3.3 Định danh dòng vi khuẩn lactic có khả năng sinh acid lactic cao bằng kỹ thuật sinh học phân tử kết hợp đặc điểm hình thái và sinh hóa

Thông qua quá trình kiểm tra đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa dòng vi khuẩn CMT2 được định danh bằng phương pháp giải trình tự đoạn gen 16S rRNA.



**Hình 3: Kết quả giải trình tự vùng gen 16S rRNA của dòng CMT2**

Sử dụng chương trình BLAST SEARCH để so sánh mức độ tương đồng của trình tự được giải với trình tự của các dòng vi khuẩn trong ngân hàng gen trên NCBI. Kết quả cho thấy trình tự đoạn gen của dòng CMT2 tương đồng với trình tự đoạn gen 16S rRNA của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* strain JCM 1149 với độ tương đồng là 99% (1456/1461) và độ bao phủ 99% (Accession: NR 117813.1). Dựa vào đặc điểm hình thái, sinh hóa của dòng CMT2: que ngắn, không có khả năng chuyển động, Gram (+), catalase và oxidase âm tính, có khả năng sinh acid lactic phù hợp với miêu tả của (Lương Đức Phẩm, 2006) về dòng *Lactobacillus* sp.; có thể kết luận dòng CMT2 là dòng *Lactobacillus plantarum* đã được đăng ký trên GenBank với mã số MN841920 và được sử dụng trong thí nghiệm khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men dưa bòn bòn.

**3.4 Sự ảnh hưởng của pH, nồng độ muối và mật số vi khuẩn đến quá trình lên men dưa bòn muối chua**

Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của pH, nồng độ muối và mật số vi khuẩn đến quá trình lên men dưa

bòn bòn theo bố trí của thể thức Box–Behnken (Design Expert 7.0) được trình bày ở Bảng 3.

Với kết quả pH và hàm lượng acid actic tạo ra sau khi lên men của 15 nghiệm thức trong Bảng 3 cho ta thấy trong cùng một mức bố trí pH ban đầu, ở những nghiệm thức có hàm lượng acid lactic cao thì pH còn lại sau lên men thấp hơn so với nghiệm thức có hàm lượng acid lactic thấp. Nồng độ acid của môi trường lên men ảnh hưởng rất lớn đến hiệu suất hoạt động và quá trình lên men của vi khuẩn. Nếu môi trường lên men có nồng độ acid quá cao sẽ ảnh hưởng đến quá trình hoạt động của vi khuẩn, có thể sẽ khiến chúng hoạt động kém dẫn đến sự chuyển hóa của chúng cũng sẽ chậm lại. Đồng thời các vi sinh vật có khả năng hoạt động ở môi trường acid cao sẽ phát triển, ngăn cản tác dụng của vi khuẩn gây chua. Do đó cần tạo môi trường có độ acid thích hợp cho các vi khuẩn lactic hoạt động.

Kết quả cho thấy pH của sản phẩm lên men bòn bòn ở tất cả các nghiệm thức đều thấp hơn so với pH ban đầu. Mức pH sau lên men dao động từ 3,17 (nghiệm thức 12) đến 3,60 (nghiệm thức 10). Hàm lượng acid lactic tổng số sau lên men của các

nghiệm thức nằm trong khoảng từ 3,96 g/L đến 6,21 g/L với nghiệm thức 15 (pH= 5,5, [NaCl] = 4% và MSVK  $5 \times 10^8$  tế bào/mL) cho lượng acid lactic cao nhất 6,21 (g/L) cao hơn các nghiệm thức 13 và 14 (pH= 5,5, [NaCl] = 4% và MSVK  $5 \times 10^8$  tế bào/mL) cho lượng acid lactic lần lượt là 6,12 (g/L) và 6,08 (g/L) nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu dưa cải lên men (Nguyễn Văn Mười, 2013) với dịch phối chế ban đầu có nồng độ muối là 4%, sau 6 ngày lên men

cho sản phẩm có hàm lượng acid cao nhất và chất lượng tốt nhất. Kết quả thực nghiệm về giá trị pH của nghiệm thức 15 (pH 5,5, [NaCl] = 4% và MSVK  $5 \times 10^8$ ) sau 6 ngày lên men cho ra giá trị pH 3,19. Kết quả này phù hợp với giá trị pH của nghiên cứu lên men dưa cải sau 6 ngày (Nguyễn Văn Mười, 2013) khi tất cả các mẫu sau khi kết thúc quá trình lên men đều có giá trị pH dao động trong khoảng 3,1-3,6.

**Bảng 3: Giá trị pH và hàm lượng acid lactic (g/L) của quá trình lên men bằng dòng vi khuẩn CMT2 của 15 nghiệm thức**

NT	pH – Nồng độ muối (%) – MSVK (tb/mL)	pH TB sau lên men			Lượng acid lactic TB (g/L)		
		2 ngày	4 ngày	6 ngày	2 ngày	4 ngày	6 ngày
1	4,5 – 3,5% - $5 \times 10^8$	3,90	3,78	3,50	2,75 <sup>bc</sup>	4,55 <sup>ef</sup>	4,73 <sup>cdef</sup>
2	6,5 – 3,5% - $5 \times 10^8$	4,52	3,81	3,52	2,48 <sup>cd</sup>	5,48 <sup>b</sup>	5,36 <sup>b</sup>
3	4,5 – 4,5% - $5 \times 10^8$	3,98	3,65	3,57	2,43 <sup>de</sup>	4,16 <sup>g</sup>	4,28 <sup>fg</sup>
4	4,5 – 4,0% - $1 \times 10^9$	3,84	3,49	3,36	2,03 <sup>f</sup>	5,00 <sup>c</sup>	5,13 <sup>bc</sup>
5	4,5 – 4,0% - $1 \times 10^5$	3,80	3,39	3,33	2,12 <sup>f</sup>	4,32 <sup>fg</sup>	5,41 <sup>efg</sup>
6	6,5 – 4,0% - $1 \times 10^5$	4,68	4,01	3,32	2,30 <sup>def</sup>	4,55 <sup>ef</sup>	4,68 <sup>cdef</sup>
7	4,5 – 4,0% - $1 \times 10^9$	3,88	3,78	3,39	2,75 <sup>bc</sup>	4,73 <sup>de</sup>	4,82 <sup>bcd</sup>
8	6,5 – 4,0% - $1 \times 10^9$	4,43	3,67	3,31	2,79 <sup>b</sup>	4,73 <sup>de</sup>	5,09 <sup>bcd</sup>
9	5,5 – 3,5% - $1 \times 10^5$	4,22	3,58	3,48	2,79 <sup>b</sup>	5,06 <sup>c</sup>	5,13 <sup>bc</sup>
10	5,5 – 4,5% - $1 \times 10^5$	4,39	4,02	3,60	2,21 <sup>def</sup>	3,41 <sup>h</sup>	3,96 <sup>g</sup>
11	5,5 – 3,5% - $1 \times 10^9$	4,42	3,57	3,32	2,16 <sup>ef</sup>	4,82 <sup>cd</sup>	4,91 <sup>bcd</sup>
12	5,5 – 4,5% - $1 \times 10^9$	4,47	3,64	3,30	2,30 <sup>def</sup>	4,32 <sup>fg</sup>	4,50 <sup>defg</sup>
13	5,5 – 4,0% - $5 \times 10^8$	3,68	3,46	3,17	3,29 <sup>a</sup>	5,85 <sup>a</sup>	6,12 <sup>a</sup>
14	5,5 – 4,0% - $5 \times 10^8$	3,65	3,46	3,19	3,29 <sup>a</sup>	5,94 <sup>a</sup>	6,08 <sup>a</sup>
15	5,5 – 4,0% - $5 \times 10^8$	3,66	3,41	3,19	3,33 <sup>a</sup>	5,99 <sup>a</sup>	6,21 <sup>a</sup>
CV%							9,6

Ghi chú: Số liệu trong bảng là trung bình của 2 lần lặp lại. Trong cùng một cột các số có cùng kí tự theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5 % (P < 0,05); MSVK: mật số vi khuẩn (tb/mL)

Để xác định giá trị tối ưu về các nhân tố pH ban đầu, nồng độ muối và mật số vi khuẩn để cho lượng acid lactic tối ưu phải xây dựng phương trình hồi quy dựa trên kết quả lượng acid lactic thu được sau 6 ngày lên men dựa trên nền tảng của 15 nghiệm thức được bố trí bằng phần mềm Design Expert 7.0, qua thu thập và phân tích số liệu bằng phần mềm Design Expert 7.0 với độ tin cậy 95%, đưa ra được phương trình hồi quy là:

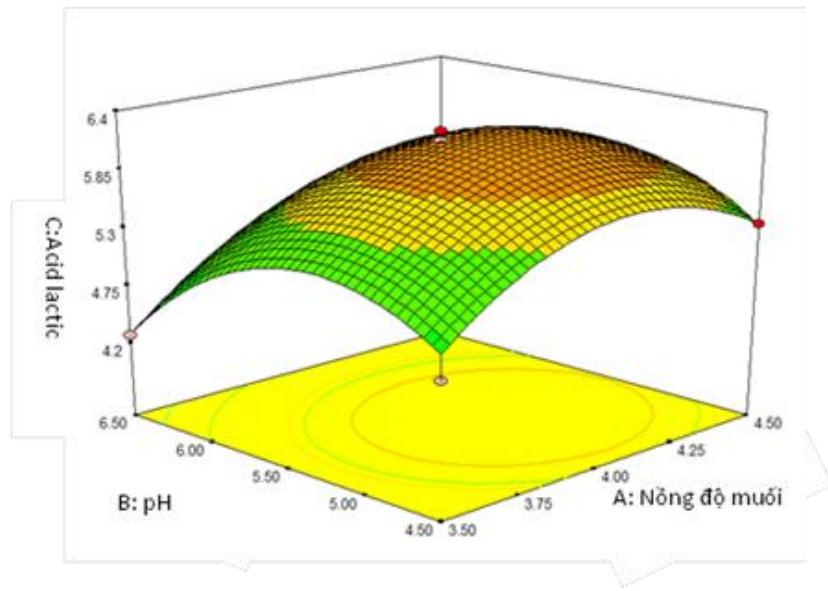
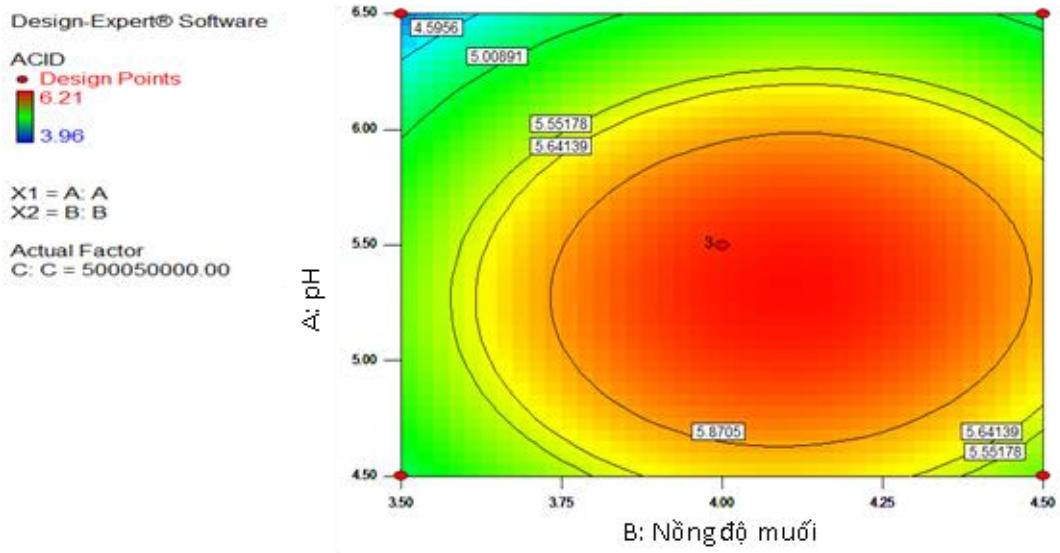
$$\text{Acid lactic (g/L)} = -49,245 + 18,135 \cdot A + 6,70496 \cdot B + (14458E-009) \cdot C + 0,115 \cdot A \cdot B +$$

$$0,00 \cdot A \cdot C + (382538E-010) \cdot B \cdot C - 2,2825 \cdot A^2 - 0,69438 \cdot B^2 = 0,00 \cdot C^2 \quad (1)$$

Trong đó: A là giá trị pH, B là nồng độ muối (%) và C là mật số vi khuẩn (MSVK) (tế bào/mL).

Tuy nhiên, việc lựa chọn điều kiện phù hợp với dòng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CMT2 phải căn cứ vào 30 nghiệm thức tối ưu mà phần mềm Design Expert 7.0 đưa ra kết hợp với phương trình hồi quy (1). Tiến hành kiểm tra thực nghiệm đối với 3 trên tổng số 30 nghiệm thức tối ưu được dự đoán bởi phần mềm Design Expert 7.0, kết quả được thể hiện qua Bảng 4.





**Hình 4:** Biểu đồ đường thể hiện sự tương quan giữa pH ban đầu, nồng độ muối đến quá trình lên men dưa bòn bòn (A); Biểu đồ bề mặt đáp ứng của pH và nồng độ muối của dưa bòn bòn (B)

**Bảng 4:** So sánh hàm lượng acid lactic tổng số theo thuật toán và thực nghiệm của 3 nghiệm thức tối ưu từ phần mềm Design Expert 7.0 (g/L)

NT	[NaCl]- pH -MSVK (tb/mL)	pH sau lên men	Lượng acid lactic thực tế (g/L)	Lượng acid lactic theo thuật toán (g/L)
1	4,08%-4,87-5,1x10 <sup>8</sup>	3,26	5,71 <sup>a</sup>	6,06
2	3,87%-5,62-5,2x10 <sup>8</sup>	4,21	4,95 <sup>b</sup>	5,98
3	3,95%-5,26-4,4x10 <sup>8</sup>	3,97	5,15 <sup>b</sup>	6,11
CV%			8,10%	

Ghi chú: Số liệu trong là trung bình của 3 lần lặp lại. Trong cùng một cột các số có mang các kí tự theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5 % (P < 0,05).

Dựa vào kết quả Bảng 4, kết quả thực nghiệm 3 nghiệm thức tối ưu cho thấy, ở nghiệm thức 1 (pH 4,87, [NaCl] = 4,08% và MSVK=  $5,1 \times 10^8$  tế bào/mL) cho lượng acid lactic cao nhất sau lên men là 5,71 (g/L) và pH sau lên men là 3,26, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức cho lượng acid lactic thấp nhất 4,95 (g/L) và nghiệm thức 3 (cho kết quả lượng acid lactic là 5,15 (g/L)). Kết quả này thấp hơn kết quả được dự đoán theo mô hình tối ưu tính bằng phần mềm Design Expert 7.0 (thực tế cao nhất thu được là 5,71 g/L) so với kết quả dự đoán cao nhất là 6,11 g/L). Do đó, các thông số của nghiệm thức 1 với pH 4,87, NaCl 4,08% và MSVK  $5,1 \times 10^8$  tế bào/mL được chọn là thông số tối ưu cho quá trình lên men dưa bòn bòn.

So sánh với kết quả của Lâm Thị Việt Hà và Nguyễn Văn Mười (2006) về các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men bắp cải chua, nồng độ muối thuận lợi là 2,0-2,5%, nguyên liệu bắp cải để nguyên lá cho cảm quan tốt tương ứng ở nhiệt độ lên men là 30°C (6-7 ngày), đối với bắp cải cắt nhỏ nhiệt độ thích hợp là 18°C (9-10 ngày). Hàm lượng lactic acid sinh ra để mùi vị dưa tốt nhất khoảng 10,60-12,70% (tính theo căn bản khô). Bên cạnh đó, nghiên cứu của Nguyễn Văn Mười và ctv. (2014) cho thấy tiền xử lý ngô sen tươi trong dung dịch chứa acid ascorbic 0,75% kết hợp với NaCl 0,75% và CaCl<sub>2</sub> 0,5% với thời gian ngâm 30 phút (tỷ lệ ngô sen và dịch ngâm là 1: 2) giúp ngô sen duy trì tốt độ trắng sáng và đặc tính cấu trúc.

#### 4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

Từ cây bòn bòn thu tại tỉnh Cà Mau, 24 dòng vi khuẩn được phân lập trên môi trường MRS agar. Tuy nhiên, chỉ 21 dòng phù hợp với mô tả về vi khuẩn lactic với các đặc điểm: tế bào hình que, Gram dương, catalase và oxidase âm tính, sinh acid lactic, trong đó dòng CMT2 cho hàm lượng acid cao nhất được tuyển chọn để thực hiện quá trình lên men. Kết quả định danh bằng phương pháp 16S rRNA cho thấy dòng CMT2 tương đồng 99% với dòng *Lactobacillus plantarum* đã được đăng ký trên GenBank với mã số MN841920, đây là dòng vi khuẩn được ứng dụng nhiều trong các nghiên cứu lên men muối chua. Nghiên cứu cũng đã xác định được thông số thích hợp cho quá trình lên men dưa bòn bòn là pH 4,87, nồng độ muối 4,08%, mật số vi khuẩn  $5,1 \times 10^8$  tế bào/mL với hàm lượng acid lactic đạt 5,71 g/L sau 6 ngày lên men.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Arimah, B. D., Ogunlowo, O.P., Adebayo, M.A. and Jesumirhewe, C., 2014. Identification of lactic

acid bisolated from selected Nigerian food and comparison of their bacteriocins activities. International Journal of ChemTech Research. 6: 929-937.

Behera S. S., El Sheikha, A. F., Hammami, R. And Kumar, A., 2020. Traditionally fermented pickles: How the microbial diversity associated with their nutritional and health benefits? Journal of Functional Foods, 21 pages. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103971>

Behera, S. S., Ray, R. C., and Zdolec, N., 2018. *Lactobacillus plantarum* with functional properties: An approach to increase safety and shelf-life of fermented foods. BioMed Research International, 9361614. <https://doi.org/10.1155/2018/9361614>.

Đỗ Thị Tuyết Nhung, Nguyễn Văn Thành và Nguyễn Hữu Hiệp, 2014. Định danh và xác định một số đặc tính sinh hóa của các dòng vi khuẩn lactic trong sản phẩm mứt chua cá sặc. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 33: 53-66.

El Sheikha, A. F., Levin, R. E. and Xu, J. 2018. Molecular Techniques in Food Biology: Safety, Biotechnology, Authenticity & Traceability (1st ed.). Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd, 285–308.

El Sheikha, A. F., and Hu, D. M., 2020. Molecular techniques reveal more secrets of fermented foods. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 60: 11–32.

Hammes, W. P., & Hertel, C. (2009). Genus I. *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212AL. Bergey's manual of systematic bacteriology, 3, 465-511.

Harutoshi, T., 2013. Exopolysaccharides of lactic acid bacteria for food and colon health applications. In M. Kongo (Ed.). Lactic Acid Bacteria. London, UK: IntechOpen, 515–538.

Huỳnh Ngọc Thanh Tâm, Đào Mộng Thu, Lê Trang Đài, Nguyễn Thị Minh Trâm, 2020. Phân lập, tuyển chọn, định danh và ứng dụng dòng vi khuẩn lactic lên men dưa môn ngứa (*Colocasia esculenta* (L.) Schott). Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. 13: 38-45.

Huỳnh Ngọc Thanh Tâm, Nguyễn Lê Hồng Diệp và Phan Thị Thu Sương, 2019. Phân lập và tuyển chọn dòng vi khuẩn *Lactobacillus* có tiềm năng probiotic từ cây môn ngọt (*Colocasia esculenta* (L.) SCHOTT). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(1): 15-23.

Irkin, R., and Songun, G. E., 2012. Applications of probiotic bacteria to the vegetable pickle products. Scientific Reviews & Chemical Communications, 2: 562–567.

Kandasamy, S., Kavitate, D., and Shetty, P. H., 2018. Lactic acid bacteria and yeasts as starter cultures for fermented foods and their role in commercialization of fermented foods. In S.

- Panda, & P. Shetty (Eds.). *Innovations in Technologies for Fermented Food and Beverage Industries*. Cham, Switzerland: Springer, 25–52.
- Lâm Thị Việt Hà và Nguyễn Văn Mười, 2006. Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men bắp cải muối chua. *Tạp chí Nghiên cứu Khoa học - Trường Đại học Cần Thơ*, 5:123-130.
- Leroy, F., and De Vuyst, L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15: 67–78.
- Lương Đức Phẩm, 2006. *Nấm men công nghiệp*. NXB Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội, 331 trang.
- Mazzoli, R., Bosco, F., Mizrahi, I., and Bayer, E.A., 2014. Towards lactic acid bacteria-based biorefineries. *Biotechnology Advances*. 32(7): 1216-1236.
- Mukisa, I. M., Byaruhanga, Y. B., Muyanja, C. M. B. K., Langsrud, T. and Narvhus, J. A., 2017. Production of organic flavor compounds by dominant lactic acid bacteria and yeasts from Obushera, a traditional sorghum malt fermented beverage. *Food Science & Nutrition*, 5: 702–712.
- Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đăng Đức, Đặng Hồng Nguyên, Phạm Văn Ty, Nguyễn Vĩnh Phước, Nguyễn Phùng Tiến. 1976. Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học tập 1,2,3. NXB Khoa học kỹ thuật.
- Nguyễn Thị Minh Hằng và Nguyễn Minh Thư, 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: 1-8.
- Nguyễn Văn Mười, Huỳnh Ngọc Tâm và Trần Thanh Trúc 2014. Ảnh hưởng của tiền xử lý và phương thức bảo quản đến sự ổn định màu sắc và đặc tính cấu trúc của ngó sen sau thu hoạch. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ Số chuyên đề: Nông nghiệp*. 1: 116-123.
- Nguyễn Văn Mười, Vương Tô Trình và Trần Thanh Trúc. 2013. Xác định chế độ tiền xử lý nhiệt nguyên liệu và nồng độ muối ban đầu của dịch lên men đến chất lượng dưa cải. *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ, Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học*: 29: 25-31.
- Suzuki, C., Kobayashi, M., and Kimoto-Nira, H., 2013. Novel exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, and the diversity of *epsE* genes in the exopolysaccharide biosynthesis gene clusters. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77 (10): 2013–2018.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane, D. J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 173(2): 697-703. <https://jb.asm.org/content/173/2/697.short>