

Đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn lactic phân lập trên địa bàn thành phố Hà Nội

Mai Đàm Linh^{1,*}, Đỗ Minh Phương¹, Phạm Thị Tuyết¹,
Kiều Hữu Ảnh¹, Nguyễn Thị Giang²

¹Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam

²Phòng Vi sinh, Viện Dinh Dưỡng, 1 Yersin, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 02 tháng 4 năm 2007

Tóm tắt. Việc sử dụng các chủng vi khuẩn lactic trong đời sống ngày càng phổ biến. Trong nghiên cứu này, đã phân lập được một lượng lớn các chủng vi khuẩn lactic từ các mẫu lên men chua ứng dụng từ quá trình lên men lactic. Trong số này, 3 chủng vi khuẩn lactic L₀, L₁, Dr₁ được lựa chọn để nghiên cứu sâu với các tiêu chuẩn bao gồm sinh axit lactic lớn (trên 200⁰T), phổ kháng khuẩn rộng, hoạt tính proteaza cao, đồng thời sinh trưởng tốt trên môi trường cải biến để có thể lên men với dung tích lớn, tiết kiệm chi phí sản xuất so với môi trường đặc hiệu.

Từ khóa: probiotic, vi khuẩn lactic, lên men lactic.

1. Đặt vấn đề

Việc sử dụng các chủng vi khuẩn lactic trong phòng ngừa và điều trị bệnh cũng như phục hồi và duy trì sức khỏe ngày càng phổ biến. Ngày nay, chúng còn được sử dụng trong điều trị làm điều chỉnh miễn dịch, giảm cholesterol, ngăn ngừa ung thư [1]... Các sản phẩm probiotic có nguồn gốc từ vi khuẩn lactic xuất hiện nhiều trong cả lĩnh vực thực phẩm bổ dưỡng [2].

Lactobacillus là nhóm vi khuẩn lactic được sử dụng nhiều nhất trong lĩnh vực probiotic[3]. Hoạt động của *Lactobacillus* rất hiệu quả trong việc tạo khả năng bám dính vào tế bào, loại trừ hoặc làm giảm sự lan truyền bệnh, tính bền vững và khả năng nhân lên [4,5]...

Ở Việt Nam, việc nghiên cứu và sử dụng các sản phẩm probiotic có nguồn gốc từ vi khuẩn lactic còn rất hạn chế. Nghiên cứu này nhằm tìm ra các chủng vi khuẩn lactic có khả năng ứng dụng để tạo ra các sản phẩm probiotic cho thị trường Việt Nam.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vi sinh vật

Các chủng vi khuẩn lactic được phân lập từ các mẫu lên men chua thu thập tại Hà Nội.

2.2. Môi trường

- Sử dụng môi trường MRS trong phân lập và nghiên cứu đặc tính sinh học của vi khuẩn lactic.

* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-4-8588856.
E-mail: linhmd@vnu.edu.vn

- Môi trường cải biến I (100g rau cải xanh, 20g đường kính, 1g K_2HPO_4 , 0,5g $MgSO_4$: bổ sung tới 1000ml nước.)

- Môi trường cải biến II: (100g cà chua, 20g đường kính, 1g K_2HPO_4 , 0,5g $MgSO_4$: 5g cao nấm men bổ sung tới 1000ml nước.)

- Môi trường cải biến III: (100g giá đỗ, 20g đường kính, 5g cao nấm men bổ sung tới 1000ml nước.)

2.3. Phương pháp

Sử dụng các phương pháp nghiên cứu vi sinh vật thông dụng trong việc phân lập và xác định các đặc điểm sinh học của vi khuẩn lactic.

Khả năng sinh axit của các chủng vi khuẩn

lactic được xác định bằng phương pháp chuẩn độ Therner ($^{\circ}T$).

Xác định hoạt tính kháng khuẩn và hoạt tính enzym theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch..

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Phân lập vi khuẩn lactic

Từ 17 mẫu khác nhau, đã tiến hành phân lập các chủng vi khuẩn lactic trên môi trường MRS. Kết quả đã phân lập được 50 chủng vi khuẩn lactic. Dựa vào kết quả phân lập, đã lựa chọn được 10 chủng thể hiện khả năng sinh axit lactic cao nhất. Đặc tính sinh học của các chủng này được trình bày tại bảng 1.

Bảng 1. Đặc điểm hình dạng của 10 chủng vi khuẩn lactic tuyển chọn

Chủng	Hình dạng tế bào	Hình dạng khuẩn lạc	Chủng	Hình dạng tế bào	Hình dạng khuẩn lạc
L_0	Que ngắn xếp chuỗi	Tròn, trong, nhỏ	N_{10}	Que mảnh xếp chuỗi	Tròn, nhỏ, trắng sữa
L_1	que chuỗi dài	Tròn, trắng	Dr_1	Que dài	Tròn, trắng sữa
L_2	Que xếp chuỗi ngắn	Tròn, trắng sữa, chân trắng trong	Dr_3	Que dài (tế bào mập)	Tròn, trắng sữa
N_3	Que ngắn, xếp chuỗi dài	Tròn, trắng, sữa	Dc_2	Que ngắn xếp chuỗi (tế bào mập)	Tròn, đục
N_7	Que, chuỗi dài	Tròn, trắng đục	Dc_3	Que ngắn xếp chuỗi	Tròn, trắng sữa

Các chủng vi khuẩn này đều mang nhiều đặc tính của nhóm *Lactobacillus*, vì vậy được lựa chọn để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

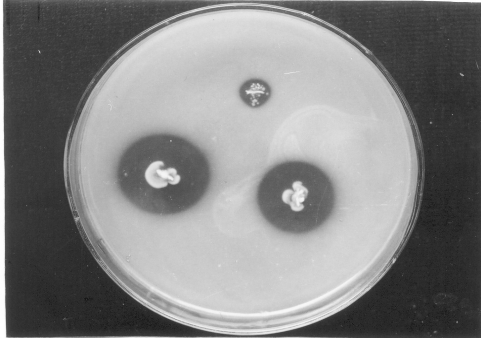
3.2. Định lượng axit lactic sinh ra từ các chủng tuyển chọn

10 chủng sinh axit lactic cao nhất được tiến hành nuôi cấy trên môi trường MRS dịch thể, ở $37^{\circ}C$ từ 24 -96 giờ, sau đó xác định lượng axit lactic tạo thành theo phương pháp Therme. Kết quả trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Khả năng sinh axit lactic của 10 chủng lựa chọn

STT	Chủng	Lượng axit tạo thành (tính theo độ $^{\circ}T$)			
		24 giờ	48 giờ	72 giờ	96 giờ
1	L_0	204	244	269	258
2	L_1	199	248	263	258
3	L_2	193	240	249	253
4	N_3	204	239	266	253
5	N_7	198	240	260	232
6	N_{10}	219	235	262	250
7	Dr_1	194	251	266	255
8	Dr_3	244	226	251	254
9	Dc_2	157	210	267	259
10	Dc_3	202	204	258	255

Kết quả cho thấy lượng axit lactic sinh ra ở các thời điểm khác nhau là khác nhau. Lượng axit tăng dần theo thời gian từ 24 giờ đến 72 giờ và có xu hướng giảm dần sau 72 giờ, qua đó cho thấy lượng axit sinh ra đạt cực đại trong khoảng thời gian từ 48 giờ đến 72 giờ.



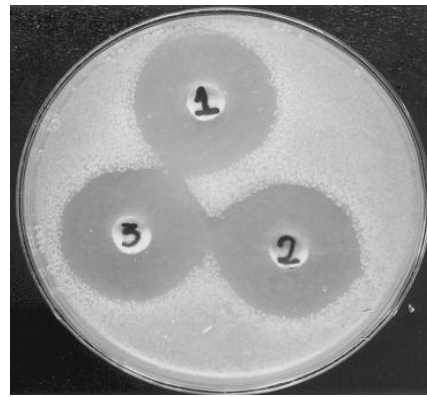
Hình 1. Khả năng sinh axit lactic của chủng L1 trên MT MRS.

3.3. Hoạt tính ức chế các vi khuẩn gây bệnh

10 chủng vi khuẩn lactic tuyển chọn được nuôi cấy trên môi trường MRS dịch thể trong

72h/37⁰C sau đó ly tâm thu lấy dịch trong. Tiến hành phân tích hoạt tính theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Kết quả trình bày ở bảng 3.

Bảng 3 cho thấy cả 10 chủng trên đều có khả năng ức chế vi khuẩn kiểm định, phổ kháng rộng (kháng được cả vi khuẩn Gram dương và Gram âm) đường kính vòng phân giải cao (trên 10mm), trong đó có 4 chủng thể hiện hoạt tính cao nhất: **L₀, L₂, R₁, Dc₂**.



Hình 2. Hoạt tính ức chế *Shigella* sp. của chủng L₀ (1); L₁ (2); Dr₁ (3).

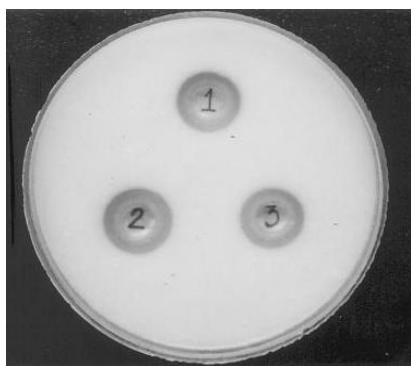
Bảng 3. Hoạt tính ức chế vi khuẩn kiểm định của các chủng nghiên cứu

STT	Chủng	Hoạt tính ức chế (D – d,mm)			
		<i>Bacillus</i> .sp	<i>E.coli</i>	<i>Sighella</i>	<i>Saccina</i>
1	L₀	21	20	25	22
2	L₁	21	17	26	23
3	L₂	20	18	25	29
4	N ₃	17	17	25	20
5	N ₇	18	15	26	22
6	N ₁₀	17	16	25	21
7	Dr₁	20	18	26	21
8	Dr ₃	19	17	25,5	20
9	Dc₂	19	17	26	26
10	Dc ₃	17	15	25	26

3.4. Hoạt tính phân giải protein (hoạt tính proteaza)

10 chủng vi khuẩn lactic tuyển chọn được nuôi cấy trên môi trường MRS dịch thể trong 72h/37⁰C sau đó ly tâm thu lấy dịch trong. Việc

xác định hoạt tính phân giải casein và gelatin được tiến hành theo phương pháp khoan lỗ thạch. Sau khi ủ 48 giờ trong tủ ấm 37⁰C, các đĩa petri được lấy để đo đường kính vòng phân giải. Kết quả trình bày ở bảng 4, hình 3.



Hình 3. Hoạt tính proteaza của 3 chủng L₀(1); L₁ (2); Dr₁ (3).

Bảng 4. Năng lực phân giải protein của 10 chủng nghiên cứu

Chủng	Hoạt tính phân giải (D – d, mm)	
	Cazein	Gelatin
L ₀	11	23
L ₁	12	24
L ₂	11	22
N ₃	11	21
N ₇	11	21
N ₁₀	10	24
Dr ₁	11	22
Dr ₃	11	22
Dc ₂	11	20
Dc ₃	10	22

Bảng 4 cho thấy cả 10 chủng trên đều có khả năng phân giải protein, trong đó có 5 chủng thể hiện hoạt tính phân giải mạnh nhất là: **L₀, L₁, L₂, Dr₁, Dr₃**.

3.5. Nghiên cứu một số môi trường nuôi cấy đơn giản và đánh giá hoạt tính của các chủng vi khuẩn tại các môi trường đó

Ba môi trường được tiến hành thử nghiệm để nuôi cấy các chủng vi khuẩn lactic bao gồm môi trường I, II, III. Sau đó đánh giá các hoạt tính của các chủng thí nghiệm theo các phương pháp thông thường.

3.5.1. Khả năng sinh axit lactic

Tiến hành nuôi cấy 3 chủng vi khuẩn L₀, L₁, Dr₁ trên 3 môi trường thử nghiệm là I, II, III ở

37°C trong 72 giờ sau đó xác định hàm lượng axit lactic được sinh ra theo phương pháp chuẩn độ Therner. Kết quả trình bày tại bảng 5.

Bảng 5. Khả năng sinh axit của 3 chủng L₀, L₁, Dr₁

Chủng	Lượng axit tạo thành (tính theo độ °T)		
	I	II	III
L ₀	147	73	78
L ₁	159	69	9
Dr ₁	121	11	98

Kết quả ở bảng 5 cho thấy cả 3 chủng L₀, L₁, Dr₁, đều sinh axit ở cả ba môi trường tuy không mạnh như trên môi trường MRS nhưng vẫn thể hiện hoạt tính cao trong đó tại môi trường I (rau cải) 3 chủng sinh axit cao nhất.

3.5.2. Khả năng ức chế các vi khuẩn gây bệnh

Tiến hành nuôi cấy 3 chủng vi khuẩn L₀, L₁, Dr₁ trên 3 môi trường thử nghiệm là I, II, III, ở 37° trong 72 giờ, ly tâm thu lấy dịch trong và tiến hành theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch.. Kết quả trình bày ở bảng 6.

Bảng 6. Khả năng ức chế vi khuẩn kiểm định trên các môi trường của các chủng nghiên cứu

Môi trường	Chủng kiểm định	Hoạt tính ức chế (D – d, mm)		
		L ₀	L ₁	Dr ₁
I	<i>Bacillus</i> sp.	19	14	17
	<i>E.coli</i>	6	4	5
	<i>Shigella</i> sp.	23	22	22
	<i>Sarcina</i> sp.	21	20	20,5
II	<i>Bacillus</i> sp.	14	8	12
	<i>E.coli</i>	3	2	3
	<i>Shigella</i> sp.	17	15	15,5
	<i>Sarcina</i> sp.	13	12,5	14
III	<i>Bacillus</i> sp.	13	10	11
	<i>E.coli</i>	3	3	3
	<i>Shigella</i> sp.	18	17,5	16
	<i>Sarcina</i> sp.	14	16	15,5

Bảng 6 cho thấy: Cả 3 chủng L₀, L₁, Dr₁, khi nuôi trên các môi trường I, II, III đều có khả năng ức chế các vi khuẩn kiểm định tuy vậy tại môi trường I (môi trường Rau cải) các chủng có

hoạt tính ức chế mạnh nhất (đường kính vòng ức chế trên 20mm).

3.5.3. Năng lực phân giải protein

Các chủng vi khuẩn L₀, L₁, Dr₁, được nuôi trên các môi trường I, II, III trong 72 giờ, sau đó tiến hành theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Kết quả được trình bày ở bảng 7.

Bảng 7. Năng lực phân giải protein của các chủng nghiên cứu

Môi trường	Cơ chất	Hoạt tính phân giải (D-d, mm)		
		L ₀	L ₁	Dr ₁
I	Cazein	4	3	3
	Gelatin	9	8	7,5
II	Cazein	3	3	2,5
	Gelatin	7	7,5	6
III	Cazein	2	2	2,5
	Gelatin	5	6	6

Bảng 7 cho thấy: Khi nuôi trên các môi trường I, II, II cả ba chủng L₀, L₁, Dr₁, đều có khả năng phân giải protein nhưng kém hơn rất nhiều so với môi trường MRS, chỉ trên môi trường I (môi trường rau cải) ba chủng thể hiện hoạt tính phân giải mạnh hơn cả, đặc biệt là .

Các kết quả trên cho thấy trên môi trường I (môi trường rau cải xanh), các hoạt tính của các chủng vi khuẩn vẫn giữ rất tốt, đặc biệt là lượng axit lactic và hoạt tính kháng khuẩn chỉ kém hơn một chút so với môi trường MRS. Đây là một môi trường rẻ tiền và rất dễ kiếm, vì vậy có thể thay thế được môi trường MRS (là một môi trường chứa nhiều hoá chất đắt tiền) để có thể lên men với thể tích lớn ứng dụng cho việc tạo ra các chế phẩm chăn nuôi sau này.

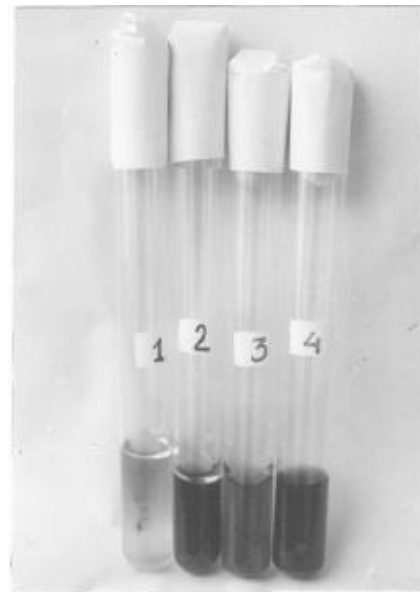
3.6. Một số đặc điểm sinh học của các chủng tuyển chọn

Các đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn tuyển chọn được trình bày tại bảng 10.

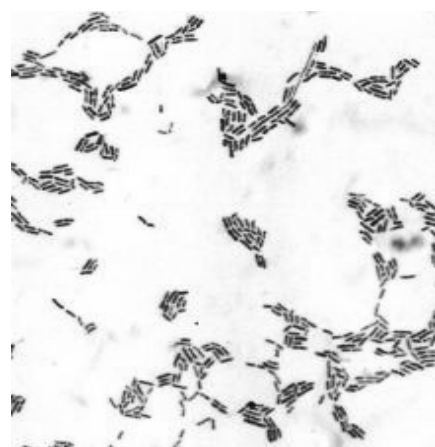
Bảng 10. Đặc điểm sinh học của 3 chủng vi khuẩn tuyển chọn

Chủng	Hdtb	Gram	O/F	Catalaza
Lo	Que ngắn	+	F	Âm tính
L1	Que dài	+	F	Âm tính
Dr1	Que ngắn	+	F	Âm tính

(Hdtb: Hình dạng tế bào)



Hình 4. Phản ứng O/F của chủng vi khuẩn.



Hình 5. Hình dạng tế bào của chủng L1.

4. Kết luận

- Trong số 50 chủng vi khuẩn lactic phân lập, đã lựa chọn được 10 chủng vi khuẩn mang nhiều đặc điểm của chi *Lactobacillus*.

- 10 chủng tuyển chọn đều sinh axit lactic cao (trên 200⁰T), hoạt tính ức chế vi khuẩn tốt, khả năng phân giải protein mạnh.

- Đã lựa chọn ra được 3 chủng có hoạt tính cao nhất và tiến hành nuôi cấy thử nghiệm trên các môi trường thông thường, rẽ tiền, kết quả cho thấy 3 chủng đều sinh trưởng tốt trên môi trường I, có thể thay thế môi trường MRS với nhiều hoá chất đắt tiền, khó kiếm.

Tài liệu tham khảo

[1] J. B. Brian, Wood, *The Lactic Acid Bacteria*, The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease.

Elsevier Applied Science, London and New York, **1**, 211- 296; 447 – 475.

- [2] A.F. Harper, E.T. Kornegay, K.L. Bryant, H. R. Thomas, “Efficacy of virginiamycin and a commercialy-available *Lactobacillus* probiotic in swine diets”, *Anim. Feed Sci. Technol.* **8** (1983) 69.
- [3] M. Champ, O. Szytli, P. Raibaud, N. Ait-Abdelkader, “Amylase production by three *Lactobacillus* strain isolated from chicken crop”, *J. Appl. Bacteriol.* **55** (1983) 487.
- [4] K.S. Muralihara, G.G. Sheggeby, P.R. Elliker, D.C. England, W.E. Sandine, “Effect of feeding lactobacilli on the coliform and *Lactobacillus* flora of intestinal tissue and feces from piglets”, *J. Food Protection* **40** (1977) 288.
- [5] S.E. Gilliland, B.B. Bruce, L.J. Bush, T.E. Stanlet, “Comparison of two strains of *Lactobacillus acidophilus* as dietary adjuncts for young calves”, *J. Dairy Sci.* **63** (1980) 964.

Study on characteristics of lactic acid bacteria isolated in Hanoi

Mai Dam Linh¹, Do Minh Phuong¹, Pham Thi Tuyet¹,
Kieu Huu Anh¹, Nguyen Thi Giang²

¹ *Department of Biology, College of Science, VNU, 334 Nguyen Trai, Hanoi, Vietnam*

² *Department of Microbiology, National Institute of Nutrition, 1 Yersin, Hanoi, Vietnam*

- Out of 50 isolated lactic bacteria strains, 10 active strains were selected which have properties of *Lactobacillus*.⁷

- 10 selected strains producing lactic acid strongly (over 200⁰T), were able to inhibit the growth of some bacteria such as *Shigella*, *E. coli*..from which three strains (L₀, L₁, Dr₁) were further studied.

- Three strains (L₀, L₁, Dr₁) grew well in medium No. I (made from some normal and cheap chemicals) which replaces MRS medium (made from some expensive chemicals).