**TUYỂN CHỌN CHỦNG VI KHUẨN LACTIC**

**VÀ ỨNG DỤNG Ủ CHUA THÂN LÁ CÂY NGÔ SAU THU HOẠCH**

**Lương Thị Vân Oanh1, Hoàng Hà Mỹ Á2, Chế Thị Cẩm Hà2\***

1Trường THPT Kông Yang, tỉnh Gia Lai,

2Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

\*Email: van.oanh8185@gmail.com

**Tóm tắt**: Việc tìm kiếm các chủng vi khuẩn có khả năng lên men lactic mạnh có ý nghĩa lớn trong việc xử lý phế phụ phẩm nông nghiệp để làm thức ăn chăn nuôi đồng thời góp phần giảm thiểu tình trạng ô nhiễm môi trường. Từ các loại rau quả muối chua trên địa bàn huyện Kông Chro - tỉnh Gia Lai, chúng tôi đã phân lập được 36 chủng vi khuẩn có khả năng lên men lactic mạnh. Đã tuyển chọn được chủng MC1 có khả năng lên men lactic mạnh, tạo vạch hòa tan CaCO3 lớn, hàm lượng axit lactic tích lũy là 19,8 mg/ml. Bằng phương pháp giải trình tự 16S RNA, đã xác đinh chủng vi khuẩn lactic MC1 tương đồng 100% với trình tự của chủng *Lactiplantibacillus plantarum* với mã số truy cập là CP094383.1.

**Từ khoá:** cây ngô,lên men lactic, vi khuẩn.

**1. MỞ ĐẦU**

Bảo quản thức ăn thô xanh cho gia súc là vấn đề đang được các nhà chăn nuôi quan tâm, nó giúp cho thức ăn của động vật không bị hư hỏng và giữ được thành phần dinh dưỡng trong một thời gian dài. Bảo quản thức ăn cho gia súc bằng phương pháp ủ chua có bổ sung vi khuẩn lactic dựa vào khả năng ức chế các vi khuẩn gây thối, gây bệnh bởi acid lactic và chất kháng sinh bacterioxin do chúng sinh ra là một phương pháp bảo quản được nhiều quốc gia trên thế giới ứng dụng [3].

Phần thân lá cây ngô sau thu hoạch là một loại phụ phẩm nông nghiệp nhưng chủ yếu được sử dụng làm chất đốt, làm chất độn chuồng, chỉ một phần nhỏ làm thức ăn cho gia súc lúc mới thu hoạch. Để nâng cao giá trị dinh dưỡng của nguồn phụ phẩm nông nghiệp này khi sử dụng làm thức ăn chăn nuôi đồng thời góp phần giảm thiểu tình trạng ô nhiễm môi trường tại địa phương, chúng tôi tiến hành nghiên cứu “Tuyển chọn chủng vi khuẩn lên men lactic và ứng dụng ủ chua thân lá cây ngô sau thu hoạch làm thức ăn chăn nuôi” nhằmgóp phần làm giảm sự thiếu hụt lượng thức ăn thô xanh trong chăn nuôi gia súc nhai lại hiện nay.

**2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

***2.1. Đối tượng nghiên cứu***

**-** Các chủng vi khuẩn lactic được phân lập từ các loại rau củ quả muối chua truyền thống trên địa bàn huyện Kông Chro, tỉnh Gia Lai.

# - Môi trường MRS (de Man Rogosa and Sharpe) có bổ sung CaCO3 (g/l): Glucose (20); Peptone (10); Cao thịt (10); Cao nấm men (5); CH3COONa (5); C6H14N2O7 (2); K2HPO4 (2); MgSO4.7H2O (2); MnSO4 (0,05); Tween 80 (1 ml; CaCO3 (5); Agar (20).

- Thân lá cây ngô sau thu hoạch.

***2.2. Phương pháp nghiên cứu***

- *Phương pháp phân lập và đếm số lượng tế bào*: sử dụng phương pháp Koch để phân lập vi khuẩn lactic trên môi trường MRS. Số lượng tế bào vi khuẩn được xác định bằng phương pháp đếm gián tiếp thông qua khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch [2].

- *Sơ tuyển các chủng vi khuẩn sinh axit lactic:* Cấy vạch các chủng vi khuẩn lên môi trường MRS có bổ sung CaCO3 và nuôi ở nhiệt độ 300C trong 60 giờ. Đo kích thước vạch cấy (d) và vạch hòa tan CaCO3 (D). Hiệu số giữa D và d phản ánh khả năng tạo axit lactic của chủng vi khuẩn [2].

*- Định lượng axit lactic:* bằng phương pháp chuẩn độ Therner [2].

- *Xác định một số đặc điểm hình thái của vi khuẩn*: quan sát khuẩn lạc vi khuẩn trên môi trường MRS, nhuộm đơn tiêu bản để quan sát tế bào [6].

- *Định danh chủng vi khuẩn*: Tách chiết DNA tổng số của vi khuẩn; khuếch đại trình tự gene vùng ITS bằng kỹ thuật PCR rồi xác định trình tự gen vùng ITS theo nguyên lý của phương pháp Sanger cải tiến, sử dụng máy đọc trình tự tự động ABI 3130XL [7]. Phân tích kết quả bằng phần mềm Sequencing Analysis 5.3 và trình tự này được so sánh với các trình tự gene vùng ITS trên ngân hàng dữ liệu NCBI bằng công cụ BLAST để định danh chủng vi khuẩn.

- Thử nghiệm ủ chua thân lá cây ngô bằng sinh khối vi khuẩn lactic được tiến hành trên 4 công thức (CT) như sau:

Tiến hành nuôi chủng đã được tuyển chọn ở pH = 5,0, nồng độ saccharose 2%, nhiệt độ 370C và thời gian nuôi cấy là 48 giờ, sau đó bổ sung vào các công thức thí nghiệm được bố trí như sau:

* CT 1 (đối chứng âm): 2 kg thân lá cây ngô
* CT 2: (đối chứng dương): 2 kg thân lá cây ngô + 100 g rỉ đường
* CT 3: 2 kg thân lá cây ngô + 100 ml sinh khối vi khuẩn lactic
* CT 4: 2 kg thân lá cây ngô + 200 ml sinh khối vi khuẩn lactic

Các chỉ tiêu của sản phẩm sau khi ủ như: mùi, vị và màu sắc được đánh giá cảm quan. Các chỉ tiêu: vật chất khô, xơ, nitơ tổng số và protein thô được đánh giá theo tiêu chuẩn AOAC.

- *Xử lý số liệu*: thí nghiệm lặp lại ba lần, số liệu được xử lí bằng thống kê mô tả và phân tích ANOVA (Duncan’s test p <0,05) bằng chương trình SPSS 20.0.

**3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**3.1. Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic**

***3.1.1. Phân lập, đếm số lượng vi khuẩn lactic***

Từ 10 mẫu thực phẩm lên men lactic thu thập trên địa bàn huyện Kông Chro, tỉnh Gia Lai đã tiến hành phân lập được 36 chủng vi khuẩn lactic trên môi trường MRS ở nhiệt độ 30oC trong 48 giờ. Số lượng vi khuẩn lactic trong các mẫu nghiên cứu được trình bày ở bảng 3.1.

***Bảng 3.1.* Số lượng vi khuẩn lactic từ các mẫu phân lập**

| **Stt** | **Loại mẫu** | **Kí**  **hiệu**  **mẫu** | **Đặc điểm**  **khuẩn lạc** | **Số lượng vi khuẩn lactic (106 CFU/ml)** |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | Nước dưa giá | NDG1 | Tròn, trơn, lồi giữa, trắng đục | 58,6 |
| 2 | Nước cải muối | NCM1 | Méo, trơn, rìa nhạt hơn tâm, trắng sữa | 77,3 |
| 3 | Nước măng chua | NMC1 | Tròn, trơn bóng, lồi, trắng ngà | 1211,6 |
| 4 | Nước dưa giá | NDG2 | Tròn, phẳng, trắng sữa | 115,7 |
| 5 | Nước cải muối | NCM2 | Tròn, lồi, trắng sữa | 135,4 |
| 6 | Nước bầu chua | NBC1 | Bờ không đều, phẳng, vàng nhạt | 73,8 |
| 7 | Nước dưa giá | NDG3 | Bờ không đều, phẳng trắng ngà | 1126,2 |
| 8 | Nước cải muối | NCM3 | Tròn, trơn, phẳng, trắng đục | 73,8 |
| 9 | Nước măng chua | NMC2 | Tròn, nhám, vàng nhạt | 66,4 |
| 10 | Nước môn chua | NM1 | Tròn, xù xì, dày, trắng | 50,8 |

*Ghi chú: CFU: Colony Forming Unit (đơn vị hình thành khuẩn lạc)*

Kết quả phân tích cho thấy, số lượng tế bào vi khuẩn không giống nhau ở các mẫu phân lập. Số lượng vi khuẩn dao động trong khoảng 50,8×106 – 1211,5×106 CFU/ml, cao nhất ở mẫu nước dưa cải muối (NDC2) với 1211,5×106 CFU/ml mẫu. Tiếp đến là mẫu nước dưa giá (NDG3) với 1126,2×106 CFU/g. Thấp nhất là mẫu nước môn chua (NM1) đạt 50,8×106 CFU/ml mẫu.

***3.1.2. Đánh giá và tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic***

Để đánh giá khả năng sinh axit lactic của các chủng vi khuẩn lactic đã phân lập, chúng tôi tiến hành nuôi cấy các chủng vi khuẩn theo phương pháp cấy vạch trên môi trường thạch đĩa MRS có bổ sung CaCO3. Những chủng vi khuẩn có khả năng sinh axit lactic sẽ tạo thành vùng trong suốt xung quanh vạch cấy.

Từ 36 chủng đã được phân lập, chúng tôi sơ tuyển các chủng có khả năng hòa tan CaCO3 mạnh. Kết quả ở bảng 3.2 cho thấy, tỷ lệ các chủng vi khuẩn có khả năng sinh axit lactic ở các mức độ khác nhau và có sự chênh lệch khá lớn. Các chủng có khả năng sinh axit mạnh và rất mạnh chiếm tỷ lệ khá cao, trong đó có 02 chủng có khả năng sinh axit lactic rất mạnh đạt 5,56%.

***Bảng 3.2*. Kết quả tuyển chọn chủng vi khuẩn sinh axit lactic mạnh**

| **Khả năng hòa tan CaCO3** | **Kích thước vạch hòa tan (D-d) (mm)** | **Số chủng** | **Tỉ lệ (%)** |
| --- | --- | --- | --- |
| Yếu | 0 < (D-d) **<** 5 | 26 | 72,22 |
| Trung bình | 5 < (D-d) **<** 10 | 3 | 8,33 |
| Mạnh | 10 < (D-d) **<**15 | 5 | 13,89 |
| Rất mạnh | (D-d) **>** 15 | 2 | 5,56 |

Với 7 chủng phân lập có vạch hòa tan CaCO3 lớn, tiếp tục khảo sát khả năng tạo axit lactic bằng cách nuôi cấy tĩnh các chủng này trong môi trường MRS dịch thể. Sau 72 giờ định lượng axit lactic tạo thành.

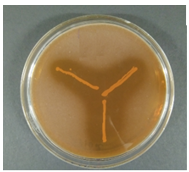
***Bảng 3.3.* Kết quả tuyển chọn chủng vi khuẩn sinh axit lactic mạnh**

| **Stt** | **Chủng vi khuẩn** | **Kích thước**  **vạch hòa tan (mm)** | **Lượng** a**xit lactic**  **tạo thành (mg/ml)** |
| --- | --- | --- | --- |
| 1 | DG2 | 11,2bcd | 12,5bcd |
| 2 | DG3 | 10,4cde | 11,8bcde |
| 3 | DC2 | 10,2cdef | 11,4cde |
| 4 | DC3 | 12,9bc | 14,7b |
| 5 | **MC1** | **17,5a** | **19,8a** |
| 6 | BC1 | 15,4ab | 13,7bc |
| 7 | M1 | 10,6cde | 11,2bcde |

*Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác trung bình*

*mẫu có ý nghĩa thống kê với p<0,05 (Duncan’s test)*

Với 7 chủng vi khuẩn lactic khi lên men cho hàm lượng acid lactic dao động từ 11,2 – 19,8 mg/ml. So sánh với nghiên cứu của Nguyễn Thị Minh Hằng (2013) về vi khuẩn lactic từ sản phẩm muối chua truyền thống có lượng acid tạo thành chỉ 1,93 – 2,18 mg/ml [1]. Nghiên cứu của Bùi Hoàng Đăng Long (2019) trên 6 chủng vi khuẩn lactic chịu nhiệt tại 39oC, sau 72 giờ có khả năng sinh acid lactic từ 6,75 – 8,55 mg/ml [4]. Nguyễn Thị Diễm Hương (2012) đã phân lập từ dưa cải được chủng thuộc loài *Lactobacillus fermentum* cho hàm lượng acid lactic 20,93 g/l [2]. Các nghiên cứu của Đào Thị Lương (2010) cho thấy hàm lượng acid đạt trong khoảng 8 – 29 mg/mlsau 48 giờ lên men ở 30oC [5].

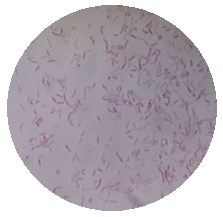
**

***Hình 1.***Vạch hòa tan CaCO3 của chủng MC1

Như vậy chủng MC1 cho kết quả lên men lactic mạnh và được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

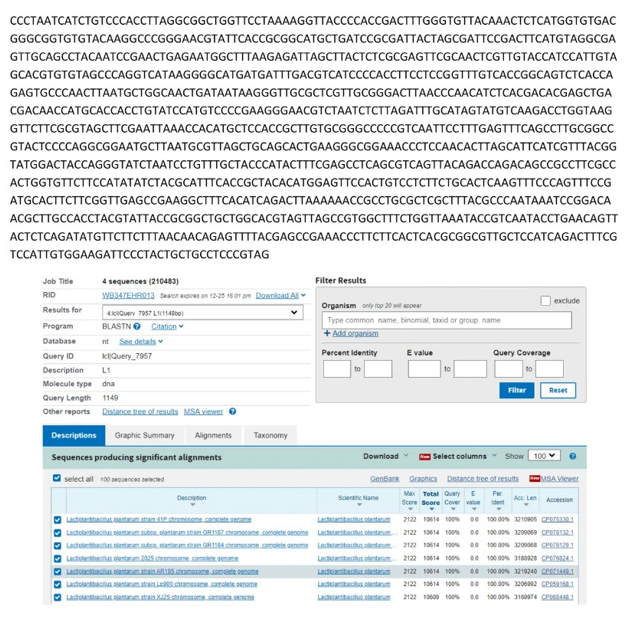
**3.2. Đặc điểm hình thái và định danh chủng vi khuẩn**

Chủng vi khuẩn MC1 được nuôi cấy trên môi trường MRS đĩa thạch sau 60 giờ có dạng tròn, bờ đều, kích thước 2 – 2,5 mm, trơn láng bóng, màu trắng sữa (hình 3.3). Quan sát tiêu bản nhuộm đơn của chủng MC1: tế bào vi khuẩn có hình que ngắn, nằm riêng lẽ hoặc kết chuỗi ngắn (hình 2).

******

***Hình 2.*  Hình thái tế bào của chủng MC1 (10×10)**

Chủng MC1 được định danh bằng giải trình tự đoạn nucleotide 16S rRNA. Kết quả được so sánh với dữ liệu Genebank trên trang web NCBI bằng công cụ BLAST SEARCH. Trình tự này tương đồng 100% với trình tự của chủng vi khuẩn *Lactiplantibacillus plantarum* với mã số truy cập là CP094383.1 đã được đăng ký trong Genebank (hình 3).

******

***Hình 3.* Kết quả giải trình tự 16S rRNA của chủng MC1 và tra cứu trên Blast Search**

**3.3. Thí nghiệm ủ chua thân lá cây ngô bằng sinh khối vi khuẩn**

Tiến hành nuôi chủng *Lactiplantibacillus plantarum* MC1 ở các điều kiện pH = 5,0, nồng độ saccharose 2%, nhiệt độ 370C và thời gian nuôi cấy là 48 giờ, sau đó bổ sung vào các công thức thí nghiệm như đã mô tả ở trên. Tiến hành ủ và theo dõi các thông số về chất lượng theo thời gian.

Kết quả đánh giá cảm quan cho thấy không có sự khác biệt lớn giữa các công thức sau 20 ngày lên men cả về mùi và màu. So với kết quả ủ chua thân lá cây ngô tại huyện Ear Kar của Bùi Thị Như Linh (2021) bằng phương pháp lên men lactic tự nhiên thì sau 30 ngày mới có hiện tượng lên men và sản phẩm mới xuất hiện mùi thơm [3].

Kết quả phân tích sau 10 ngày ủ, cho thấy: nhìn chung pH, hàm lượng nitơ tổng số, protein thô trong các công thức thí nghiệm không có sự khác nhau. Công thức đối chứng dương cũng cho kết quả thành phần nitơ tổng số, pH như các công thức 3 và 4*.*

Tỷ lệ hao hụt vật chất khô của các công thức 3 và 4 sau khi ủ 10 ngày lần lượt là 2,66% và 2,3%. Tỷ lệ hao hụt này nhỏ hơn so với công thức đối chứng dương và đối chứng âm là 11,11% và 11,71%. Kết quả cho thấy bổ sung sinh khối của chủng *Lactiplantibacillus plantarum* MC1 đã giảm hao hụt hàm lượng vật chất khô đáng kể.

***Bảng 3.4.* Đánh giá cảm quan các lô thí nghiệm theo thời gian lên men**

| **Công thức** | **5 ngày** | **10 ngày** | **20 ngày** |
| --- | --- | --- | --- |
| Đối chứng âm | Hơi ngả vàng, còn màu xanh của lá nhiều, không có mùi chua | Có mùi chua, màu vàng nâu. Có xuất hiện mốc, nhưng chưa đáng kể. | Mùi chua nồng. Xuất hiện mốc trắng ở lớp trên nhiều. |
| Đối chứng dương | Ngả vàng nâu, có mùi chua, thơm nhẹ | Màu và mùi như 5 ngày. Có xuất hiện mốc, nhưng chưa đáng kể. | Mùi chua nồng, có mùi men rượu. Có mốc trắng ở lớp phía trên |
| Công thức 3 | Ngả vàng nâu, có mùi chua, thơm nhẹ | Màu và mùi như 5 ngày. Có xuất hiện mốc, nhưng chưa đáng kể. | Mùi chua nồng, có mùi men rượu. Có mốc trắng ở lớp phía trên. |
| Công thức 4 | Ngả vàng đậm hơn công thức 1, có mùi chua nồng hơn | Màu và mùi như 5 ngày. Có xuất hiện mốc, nhưng chưa đáng kể. | Mùi chua nồng, có mùi men rượu. Xuất hiện mốc trắng ở lớp phía trên. |

***Bảng 3.5. Hàm lượng dinh dưỡng của thân lá cây ngô sau khi ủ chua***

| Thời gian | Công thức | pH | Vật chất khô (%) | Xơ (%) | Nitơ tổng số (%) | Protein thô (%) |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 10 ngày | Đối chứng âm | 4,02a | 25,26b | 75,53a | 10,10a | 6,31a |
| Đối chứng dương | 3,79a | 25,43b | 53,94b | 10,46a | 6,54a |
| Công thức 3 | 3,51a | 27,85a | 57,00b | 10,58a | 6,61a |
| Công thức 4 | 3,57a | 27,95a | 56,42b | 10,95a | 6,84a |
| 20 ngày | Đối chứng âm | 3,92a | 23,43b | 63,47a | 10,01b | 6,23b |
| Đối chứng dương | 3,64a | 24,36b | 44,38b | 11,34ab | 7,06ab |
| Công thức 3 | 3,39a | 27,35a | 42,78b | 11,61ab | 7,25ab |
| Công thức 4 | 3,41a | 27,82a | 38,75b | 12,93a | 8,08a |

Sau khi ủ chua 20 ngày, hàm lượng dinh dưỡng giữa các công thức thí nghiệm có sự khác nhau rõ rệt. Công thức 4 cho hàm lượng nitơ tổng số và protein thô cao nhất lần lượt là 12,93% và 8,08%, có lẽ là do lượng vi khuẩn lactic bổ sung nhiều hơn cả nên đã tăng tốc độ chuyển hóa. pH của các công thức thí nghiệm không có sự khác nhau có ý nghĩa thống kê. Tỷ lệ hao hụt vật chất khô của các công thức thí nghiệm vẫn ít hơn các công thức đối chứng.

Như vậy, việc ủ chua thân lá cây ngô bằng sinh khối của chủng *Lactiplantibacillus plantarum* MC1 đã đem lợi ích về mặt dự trữ lượng thức ăn thô xanh quan trọng của gia súc nhai lại khi vào mùa đông hoặc những lúc thời tiết bất lợi. Ngoài ra người chăn nuôi còn chủ động được nguồn thức ăn thô xanh quanh năm để phát triển quy mô chăn nuôi lớn.

**4. KẾT LUẬN**

1. Từ 10 mẫu thực phẩm lên men lactic thu thập trên địa bàn huyện Kông Chro, tỉnh Gia Lai đã phân lập được 36 chủng vi khuẩn lactic.

2. Tuyển chọn được chủng vi khuẩn lactic có khả năng lên men mạnh là MC1. Chủng MC1 tương đồng 100% với trình tự đoạn nucleotide vùng 16S rRNA của loài *Lactiplantibacillus plantarum* với mã số truy cập là CP071469.1.

3. Sau 20 ngày ủ chua thân lá cây ngô bằng chủng *Lactiplantibacillus plantarum* MC1, sản phẩm có màu hơi nâu, không xuất hiện mốc. Sản phẩm có mùi thơm đặc trưng, giảm tỷ lệ hao hụt vật chất khô của thân lá cây ngô sau khi ủ chua với tỷ lệ hao hụt chỉ còn 2,3 – 2,66%.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Nguyễn Thị Minh Hằng, Nguyễn Minh Thư (2013), “Phân lập 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 số 3 (1),* tr: 2 – 10.
2. Nguyễn Thị Diễm Hương, Đỗ Thị Bích Thủy (2012), "Xác định và khảo sát một số tính chất có lợi của chủng *Lactobacillus fermentum* DC1 phân lập từ sản phẩm dưa cải Huế", *Tạp chí Khoa học Đại học Huế*, 71(2), tr: 177-187.
3. Bùi Thị Như Linh, Thái Thị Bích Vân (2021). Chế biến bảo quản thân cây ngô làm thức ăn làm thức ăn cho bò thịt tại huyện Ear Kar, tỉnh Đăk Lăk. *Tạp chí KHKT Chăn nuôi*, Số 266, tr: 46-52.
4. Bùi Hoàng Đăng Long và nnk (2019). Khảo sát điều kiện lên men acid lactic từ rỉ đường sử dụng vi khuẩn lactic chịu nhiệt. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. Tập 55, Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học (2), tr: 103-109
5. Đào Thị Lương và nnk (2010), “Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn lactic dùng trong chế biến và bảo quản thức ăn thô xanh và phụ phẩm nông nghiệp cho gia súc”, *Di truyền học và ứng dụng – chuyên san công nghệ sinh học,* số 6, tr: 1-6.
6. Sook Jong Rhee, Jang-Eun Lee, Cherl-Ho Lee (2011), "Importance of lactic acid bacteria in Asian fermented foods", 10th Symposium on lactic acid Bacterium Egmond aan Zee, the Netherlands.
7. Wu, C., Zhang, J., Wang, M., and Du, G., (2012). Lactobacillus casei combats acid stress by maintaining cell membrane functionality. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 39(7): 1031-1039.

**SELECTION OF LACTIC BACTERIAL STRAINS**

**AND APPLICATIONS OF GRILLING CONTACT STRUCTURE ONLY**

**Abstract:** The search for bacterial strains with strong lactic fermentability is of great significance in the treatment of agricultural by-products for animal feed and at the same time contributes to minimizing environmental pollution. From some pickled vegetables in Kong Chro district, Gia Lai province, we have isolated 36 strains of bacteria capable of lactic acid. The MC1 strain has been selected with high lactic fermentation ability, creating line dissolving CaCO3 large with accumulated lactic acid content of 19.8 mg/mL. By 16S RNA sequencing, it was identified as *Lactiplantibacillus plantarum*.

**Keywords:** lactic acid, fermentation, maize, bacteria.