PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN LACTIC CÓ KHẢ NĂNG SINH CHẤT KHÁNG KHUẨN

Ngô Thị Phương Dung[1], Huỳnh Thị Yến Ly[1] và Huỳnh Xuân Phong[1]

ABSTRACT

This research included the isolation of lactic acid bacteria from fermented foods and lyophilized bacteria products, the examination of ability producing antibacterial substances, H_2O_2 and bacteriocin by agar spot test and well diffusion agar test using the indicated Bacillus subtilis, the identification at genus level of the growth of bacterial isolates having high antagonistic activity based on the study of the growth of bacteria in different conditions of temperature, pH, NaCl, NaN_3, manitol, gas production in fermentation from glucose and indole test. As the result, 46 strains of lactic acid bacteria were isolated and examined for production of antibacterial substances. 23 strains performed well the antibacterial activity against the indicator, of which, 10 strains were able to produce antibacterial substances. Strain DC213A was noted with the significantly highest antibacterial activity. 10 selected strains were classified belonging to the genera of Leuconostoc, Enterococcus, Lactobacillus and Streptococcus.

Keywords: Antibacterial substances, Enterococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Streptococcus

Title: Isolation and selection of lactic acid bacteria producing anti-bacterial substances

TÓM TẮT

Đề tài nghiên cứu gồm các nội dung phân lập vi khuẩn lactic từ các sản phẩm lên men và sản phẩm men tiêu hóa đông khô, kiểm tra khả năng sản sinh các chất kháng khuẩn, H_2O_2 và bacteriocin từ các dòng phân lập bằng hai phương pháp nhỏ giọt và khuếch tán trên giếng thạch kết hợp với vi khuẩn chỉ thị Bacillus subtilis, định danh cấp độ giống các dòng phân lập có hoạt tính kháng khuẩn dựa trên khảo sát sự phát triển của vi khuẩn ở các mức độ khác nhau của nhiệt độ, pH, NaCl, NaN_3, manitol, khả năng sinh khí khi lên men đường glucose và thử nghiệm indole. Kết quả phân lập được 46 dòng vi khuẩn lactic và được kiểm tra tính kháng khuẩn. 23 dòng biểu hiện tính kháng khuẩn chỉ thị B. subtilis, trong đó 10 dòng có khả năng tổng hợp bacteriocin. Dòng DC213A được ghi nhận có tính kháng khuẩn mạnh nhất. Kết quả định danh cho thấy 10 dòng này thuộc các giống Leuconostoc, Enterococcus, Lactobacillus và Streptococcus.

Từ khóa: Antibacterial substances, Enterococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Streptococcus

1 GIỚI THIỆU

Ngày nay, ngộ độc thực phẩm đã trở thành một trong những vấn đề cấp thiết cần được giải quyết để bảo vệ sức khỏe con người. Bên cạnh đó, việc dùng chất bảo quản thực phẩm hóa học đang bị hạn chế sử dụng vì những tác dụng phụ không có lợi của nó. Vì vậy, việc tìm ra những chất bảo quản vừa an toàn, vừa hiệu quả đang là vấn đề thách thức cho ngành công nghiệp chế biến thực phẩm.

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

Kết quả nghiên cứu trong những năm gần đây cho thấy vi khuẩn lactic không những có thể lên men lactic rau quả mà còn có những tác động hiệu quả trong bảo quản thực phẩm. Đặc tính của vi khuẩn lactic là Gram dương, oxydase và catalase âm tính, hình que hay hình cầu, không tạo bào tử (Abee *et al.*, 1999). Hệ vi sinh vật này là một trong những nguồn vi sinh vật sinh ra bacteriocin, dạng chất kháng khuẩn có khả năng chống lại sự phát triển của các mầm bệnh và được ứng dụng như chất bảo quản thực phẩm. Hầu hết vi khuẩn lactic đều tổng hợp được bacteriocin nên thành phần kháng khuẩn này rất đa dạng như Lactacin, Nisin, Acidolin,... Từ rất lâu các bacteriocin này đã được ứng dụng rộng rãi trong bảo quản thực phẩm, điển hình là Nisin. Năm 1953, thương phẩm Nisaplin xuất hiện trên thị trường như chất bảo quản thực phẩm và đến năm 1969, tổ chức WHO công nhận Nisin là chất bảo quản an toàn có nguồn gốc sinh học.

Ở Việt Nam, hệ vi khuẩn lactic xuất hiện chủ yếu trong sản phẩm lên men truyền thống như dưa cải muối chua, sữa chua, cơm mẻ, nem chua và một số sản phẩm men tiêu hoá đông khô. Nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu bước đầu phân lập và tuyển chọn nguồn vi khuẩn lactic có khả năng sinh chất kháng khuẩn từ các nguồn sản phẩm lên men và các sản phẩm men tiêu hoá đông khô có sẵn trên thị trường. Qua đó có thể tiến hành định danh và tiếp tục nghiên cứu điều kiện sinh chất kháng khuẩn cao để có thể ứng dụng vào sản xuất chất bảo quản thực phẩm tự nhiên.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương tiện

- Nguyên liệu: Dưa cải muối chua, kim chi, sữa chua Vinamilk, sữa chua uống Yakult, nước tàu hủ, nem chua, sản phẩm men tiêu hoá đông khô (Lactominplus, Bioacimin, Zincibio, Antibio, Probio và Probactil).
- Hóa chất: Dùng trong phương pháp nhuộm Gram và nuôi cấy vi sinh vật, thuốc thử oxydase, nartri azide và manitol.
- Môi trường nuôi cấy và phân lập: MRS agar, MRS broth và nước mắm - peptone.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Thu thập mẫu

Sữa chua Vinamilk, Yakult, Kefir và các mẫu sản phẩm lên men bao gồm kim chi, dưa cải muối chua, nem chua được thu thập tại siêu thị Coopmart. Sản phẩm men tiêu hoá đông khô Lactominplus, Bioacimin, Zincibio, Antibio, Probio và Probactil được thu thập tại nhà thuốc tây. Nước tàu hủ được thu mẫu tại cở sở sản xuất nước tàu hủ ở thành phố Cần Thơ.

2.2.2 Phân lập vi khuẩn lactic từ men tiêu hóa và thực phẩm lên men

Sản phẩm men tiêu hoá đông khô và các mẫu thực phẩm được đồng hóa, hòa tan vào môi trường MRS broth và ủ ở 37°C trong 24 giờ. Sau khi ủ, dung dịch mẫu được cấy chuyển qua môi trường MRS agar. Quá trình cấy chuyển trên đĩa môi trường thạch được lặp lại nhiều lần cho đến độ thuần vi khuẩn được xác định.

Kiểm tra hình thái khuẩn lạc đặc trưng cho vi khuẩn lactic. Những dòng vi khuẩn được chấp nhận khi có hình dạng khuẩn lạc trắng đục, không màu, bờ láng, lồi, bìa nguyên hoặc chia thùy. Khuẩn lạc này nằm trên đường cấy chuyển và không lẫn với những khuẩn lạc có hình thái và màu sắc lạ. Sau khi được tách ròng, những dòng phân lập sẽ được kiểm tra hình thái và quan sát độ thuần dưới kính hiển vi quang học. Tiến hành nhuộm Gram, thử catalase, thử oxydase, nhuộm bào tử và kiểm tra khả năng phân giải $CaCO_3$.

Vi khuẩn lactic được xác định khi những dòng phân lập có hình tròn hoặc hình que, không sinh bào tử, Gram dương, catalase âm tính, oxydase âm tính và phân giải được $CaCO_3$.

2.2.3 Khảo sát và chọn lọc các dòng vi khuẩn lactic có tính kháng khuẩn cao

Tính kháng khuẩn được kiểm tra bằng hai phương pháp chuyển đổi từ phương pháp *"agar spot"* (nhỏ giọt) và *"well diffusion agar"* (khuếch tán trên giếng thạch) của Herna´ndez *et al.* (2004). Vi khuẩn chỉ thị trong thí nghiệm này là *Bacillus subtilis* đã được phân lập thuần từ Biosubtyl II.

Phương pháp "nhỏ giọt"

Những dòng vi khuẩn lactic phân lập được nuôi trong 5ml MRS lỏng ở 30°C trong 16 giờ. Lấy 10µl dung dịch nhỏ giọt trên đĩa có chứa 10ml MRS agar để khô. Tiến hành ủ các mẫu đã nhỏ giọt vi khuẩn lactic ở 30°C trong 18 giờ. Trộn và phủ môi trường bán đặc chứa vi khuẩn chỉ thị *B. subtilis* lên đĩa đã có chứa những dòng vi khuẩn lactic phát triển. Những đĩa này được ủ trong 48 giờ ở 35°C. Quan sát và ghi nhận kích thước vùng sáng vô khuẩn xuất hiện quanh khuẩn lạc vi khuẩn lactic.

Phương pháp "khuếch tán trên giếng thạch"

Chuẩn bị dịch huyền phù của dòng chỉ thị *B. subtilis* đã được nuôi cấy qua 24 giờ với mật số 10^9 tế bào/ml. Chủng 10% dung dịch vi khuẩn này vào môi trường nước mắm - peptone 2% agar ở 50°C và tiến hành đổ đĩa. Những giếng nhỏ có đường kính 6mm được tạo ra trên mặt môi trường bằng thanh kim loại vô trùng.

Những dòng vi khuẩn lactic đã phát triển trong 2ml MRS lỏng dưới điều kiện yếm khí trong 48 giờ, ly tâm 8.000rpm trong 15 phút ở 4°C. Lấy phần nước trong của dung dịch sau ly tâm. Điều chỉnh dung dịch về pH 6,5 bằng NaOH 0,1N và trữ lạnh ở 4°C. Thu được dung dịch có khả năng có bacteriocin thô.

Lấy 80µl dung dịch bacteriocin thô nhỏ vào mỗi giếng của đĩa thạch đã chứa dòng chỉ thị. Tiến hành ủ mẫu ở 4°C trong 15 phút cho dung dịch trong giếng khuếch tán. Sau đó, đĩa được ủ ở 35°C cho vi khuẩn chỉ thị phát triển.

Xác định và chọn lọc tính kháng khuẩn của vi khuẩn lactic

Hoạt tính kháng khuẩn của những dòng vi khuẩn lactic phân lập được tính bằng đường kính vòng vô khuẩn quanh khuẩn lạc hay quanh miệng giếng trên đĩa. Tính kháng khuẩn được biểu hiện khi đường kính vòng vô khuẩn rộng hơn 2mm. So sánh khả năng kháng khuẩn của các dòng và chọn lọc những dòng vi khuẩn lactic có tính kháng khuẩn cao.

2.2.4 Định danh cấp độ giống của những dòng vi khuẩn lactic đã chọn lọc

Vi khuẩn lactic được xác định ở mức độ giống dựa vào phương pháp hình thái học của Axelsson (2004) và một số phản ứng sinh hóa đặc trưng. Kiểm tra khả năng sinh khí CO_2 khi lên men đường glucose, khảo sát sự phát triển của vi khuẩn ở 10 và 45^oC; pH 4,4 và pH 9,6; 6,5% NaCl và 18% NaCl, trong môi trường MRS agar bổ sung thêm 0,02% và 0,04% natri azide, 40% manitol và phản ứng sinh indole.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Phân lập vi khuẩn lactic từ men tiêu hóa và thực phẩm lên men

46 dòng vi khuẩn lactic đã được phân lập từ 7 loại sản phẩm lên men (sữa chua Vinamilk, Yakult, kim chi, dưa chua, Kefir, nem chua, nước chua tàu hủ) và 6 loại men tiêu hóa đông khô. Các dòng phân lập được quan sát hình thái khuẩn lạc và tế bào vi khuẩn dưới kính hiển vi. Kết quả cho thấy là vi khuẩn Gram dương, catalase âm tính, oxydase âm tính, không sinh bào tử và có khả năng phân giải $CaCO_3$. Nguồn mẫu thu thập, ký hiệu các dòng phân lập và các đặc điểm hình thái của 46 dòng vi khuẩn được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1: Đặc điểm hình thái của các dòng vi khuẩn acid lactic

Nguồn phân lập	Dòng phân lập	Hình thái tế bào vi khuẩn
Sản phẩm men tiêu hóa đông khô	Probactil	Que dài
	Lac	Cầu đơn
	Lac1	Hình chữ X
	Lac3	Que ngắn
	Bio1	Que ngắn
	Bio3	Cầu đôi
	Zin	Cầu kết đôi
	Anti	Que ngắn
	Probio	Que ngắn
Dưa chua hỗn hợp A	A3	Que dài
	A11	Que dài
	A111	Cầu kết dạng chùm
	A113	Cầu đôi
Dưa chua hỗn hợp B	B11	Cầu đơn
	B313	Que dài
Dưa chua hỗn hợp C	C21	Cầu đơn
Dưa chua	DC2112	Que ngắn
	DC213	Que ngắn hơi cong
	DC2114	Cầu đơn
	DC2113	Cầu đôi
	DC21322	Que ngắn
	DC2112D	Que ngắn hơi cong
	DC 2132	Que ngắn
	DC 213A	Que ngắn
	DC2122	Que dài
Kim chi	KC32	Cầu kết đôi,chuỗi ngắn
	KC4	Cầu kế đôi
	KC13	Que kết hình chữ V
	KC11	Que hơi dài
	KC12A	Que ngắn
Sữa chua Vinamilk	SC11	Que ngắn
	SC124	Cầu đơn

Kefir	KF12A	Que ngắn
	KF12	Cầu đơn
Yakult	YK22	Que hơi cong
	YK11	Que hơi dài
	YK222	Cầu kết đôi
Nước chua tàu hủ	TF1	Que ngắn
	TF 31	Cầu đơn
	TF 22	Cầu đôi
	TF23	Que ngắn
	TF132	Que ngắn
	TF233	Que hơi dài
Nem chua	NC 121	Cầu đơn
	NC132	Que dài
	NC2122	Que ngắn

Bên cạnh những dòng vi khuẩn được phân lập từ các mẫu thực phẩm lên men đã được xác định sơ bộ thuộc hệ vi khuẩn lactic, các dòng vi khuẩn lactic được tách ròng từ sản phẩm men tiêu hóa đông khô cũng đã được xác định ở cấp độ loài rõ ràng hơn. Vi khuẩn lactic từ Bioacimin của Công ty Visgerpharm, dòng lactic Bio1 và Bio3 đã được phân lập và có đặc tính hình thái phù hợp với *Lactobacillus acidophilus* và *Streptococcus faecalis* trong sản phẩm. Ba dòng *Lactobacillus acidophilus* cũng được tách ròng từ bột men Probio (Công ty Inmexpharm), Probactil (Công ty Mebiphar-Austrapharm) và Antibio (Công ty Han Wha Pharma, Hàn Quốc). Ba dòng vi khuẩn lactic từ Lactominplus (Công ty RexGene Biotech, Hàn Quốc) bao gồm: Lac là *Streptococcus faecalis*, Lac3 là *Lactobacillus acidophilus* và Lac1 là *Bifidobacterium longum*. Một dòng vi khuẩn lactic được tách ròng từ Zincibio (Công ty Intechpharm, Việt Nam) là *Streptococcus thermophilus*.

Tuy những dòng vi khuẩn lactic được phân lập giống nhau về những đặc tính cơ bản nhưng chúng khác nhau về hình dạng khuẩn lạc, tế bào và nguồn gốc mẫu phân lập, chứng tỏ rằng hệ vi khuẩn lactic sống khắp nơi và đa dạng về loài và đặc trưng cho từng sản phẩm lên men.

3.2 Xác định và chọn lọc những dòng vi khuẩn lactic có tính kháng khuẩn cao

Kết quả kiểm tra tính kháng khuẩn bằng phương pháp nhỏ giọt cho thấy sau 24 giờ, những vùng sáng xung quanh bề mặt vi khuẩn lactic đã xuất hiện trên đĩa. Kết quả của thí nghiệm này được trình bày qua bảng 2.

Qua bảng 2 cho thấy trong 46 dòng vi khuẩn đã được kiểm tra tính kháng khuẩn bằng phương pháp nhỏ giọt, có 23 dòng thể hiện khả năng tính kháng khuẩn, trong đó 7 dòng có tính kháng mạnh với đường kính vòng vô khuẩn lớn hơn 10mm, 11 dòng có tính kháng trung bình với đường kính vòng vô khuẩn 5 - 10mm và 5 dòng có tính kháng yếu với đường kính vòng vô khuẩn nhỏ hơn 5mm. Qua phương pháp này cho thấy hoạt tính của các thành phần kháng khuẩn có sẵn trong tế bào vi khuẩn lactic sẽ có tác động kháng lại vi khuẩn khác. Theo Ouwehand và Satu Vesterlund (2004), tế bào vi khuẩn lactic đã chứa sẵn các hợp chất có tính kháng khuẩn như reuterin, reutericyclin, acid 2-Pyrrolidone-5-carboxylic và khi chúng sinh trưởng đã tạo ra thêm những thành phần kháng khuẩn khác bao gồm acid lactic, bacteriocin, CO_2, H_2O_2 và diacetyl.

Bảng 2: Khả năng kháng *B. subtilis* của các dòng vi khuẩn acid lactic

STT	Mẫu	Vòng vô khuẩn (mm)	Tính kháng khuẩn
1	TF22	3l [1]	+ [2]
2	Bio3	4k	+
3	TF31	4k	+
4	Zin	4k	+
5	TF233	5j	+
6	DC21322	6i	++
7	DC2112D	7h	++
8	KC13	8g	++
9	KC4	8g	++
10	Probio	8g	++
11	KC11	8g	++
12	DC2113	9f	++
13	DC2132	9f	++
14	DC2112	10e	++
15	SC123	10e	++
16	Probactil	10de	++
17	DC213	11cd	+++
18	Anti	11c	+++
19	KC32	11c	+++
20	Lac3	11c	+++
21	A3	14b	+++
22	DC2114	14b	+++
23	DC213A	18a	+++

[1] *Giá trị trung bình của 3 lần lặp lại có mẫu tự giống nhau khác biệt không ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%*

[2] *Mức độ xuất hiện khả năng tính kháng khuẩn: (+): đường kính vòng vô khuẩn < 5mm; (++): đường kính vòng vô khuẩn từ 5 - 10mm; (+++): đường kính vòng vô khuẩn > 10mm*

Hình 1: Vòng kháng khuẩn mạnh (A3), trung bình (KC4) và yếu (Zin)

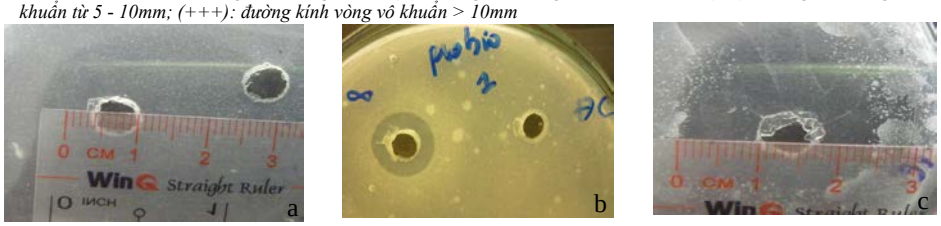
Kết quả kiểm tra tính kháng khuẩn của 23 dòng thể hiện hoạt tính bằng phương pháp khuếch tán trên giếng cho thấy 10 dòng vi khuẩn có xuất hiện vùng sáng vô khuẩn với kích thước khác nhau. Trong đó, 4 dòng phân lập có tính kháng khuẩn lớn hơn 10mm, nên thể hiện tính kháng mạnh hơn những dòng còn lại. Tiêu biểu, dòng DC213A có đường kính vòng sáng rộng nhất là 22mm, do đó thể hiện tính kháng mạnh nhất. Bên cạnh đó có 5 dòng đã cho vòng vô khuẩn nằm trong khoảng 5 - 10mm, biểu hiện tính kháng khuẩn ở mức trung bình. Dòng Zin có vòng kháng khuẩn rất nhỏ (4mm) nên tính kháng khuẩn rất yếu. Như vậy, những dòng vi khuẩn phân lập từ mẫu dưa cải muối chua và men vi sinh đông khô có tính kháng khuẩn của bacteriocin mạnh hơn các dòng phân lập từ nhiều nguồn khác. Tính kháng khuẩn bacteriocin của các dòng được trình bày trong Bảng 3. Kết quả này có tính khả quan hơn so với kết quả nghiên cứu của Onda *et al.* (1999), chỉ có 1 trong 125 dòng vi khuẩn lactic phân lập từ sản phẩm *Miso* của Nhật Bản biểu hiện tính kháng khuẩn đối với hai dòng chỉ thị *Bacillus subtilis* JCM1465 và *Staphylococcus aureus* JCM12544.

Bảng 3: Kết quả tính kháng khuẩn của bacteriocin từ dòng phân lập

STT	Mẫu	Vòng vô khuẩn (mm)	Tính kháng khuẩn
1	Zin	4h [1]	+ [2]
2	Probio	7g	++
	DC2114	8fg	++
3	DC2112D	9ef	++
4	DC2132	9ef	++
	DC2113	10de	++
5	DC213	11d	+++
6	Lac3	13c	+++
	Anti	15b	+++
7	DC213A	22a	+++

[1] Giá trị trung bình của 3 lần lặp lại có mẫu tự giống nhau khác biệt không ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%

[2] Mức độ xuất hiện khả năng tính kháng khuẩn: (+): đường kính vòng vô khuẩn < 5mm; (++): đường kính vòng vô khuẩn từ 5 - 10mm; (+++): đường kính vòng vô khuẩn > 10mm



Hình 2: Vòng kháng khuẩn từ bacteriocin của các dòng vi khuẩn lactic

a: Dòng Zin kháng khuẩn yếu; b: Dòng Probio kháng khuẩn trung bình; c: Dòng DC213A kháng khuẩn mạnh

Qua hai phương pháp kiểm tra tính kháng khuẩn, kết luận có 23 dòng vi khuẩn lactic biểu hiện kháng vi khuẩn chỉ thị *Bacillus subtilis*, trong đó có 10 dòng sinh ra chất bacteriocin để chống lại vi khuẩn chỉ thị. Vì vậy, 10 dòng vi khuẩn đã tổng hợp bacteriocin này được tiếp tục tuyển chọn để định danh ở cấp độ giống.

3.3 Định danh ở mức độ giống các dòng vi khuẩn được chọn lọc

Sử dụng 10 dòng vi khuẩn lactic đã được tuyển chọn để định danh ở mức độ giống dựa vào phương pháp hình thái học, các thử nghiệm sinh hóa và khả năng phát triển ở các điều kiện khác nhau. Trong 10 dòng này có 4 dòng từ sản phẩm men tiêu hóa đã được xác định từ thí nghiệm trên, bao gồm: Probio, Lac3 và Anti là *Lactobacillus acidophilus* và Zin là *Streptococcus thermophiplus*. Vì vậy, các thí nghiệm khảo sát sự phát triển chỉ thực hiện với 6 dòng phân lập từ dưa chua và kết quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4: Kết quả sự phát triển của các dòng vi khuẩn acid lactic sinh bacteriocin

Các nhân tố định tính	DC213A	DC213	DC2132	DC2112D	DC2114	DC2113
Hình thành tứ cầu (tetrad)	-	-	-	-	-	-
CO_2 từ lên men glucose	-	-	-	+	+	-
Phát triển ở 10°C	+	+	+	+	+	+
Phát triển ở 45°C	+	-	-	-	-	+
Phát triển ở 6,5% NaCl	+	+	+	+	+	+
Phát triển ở 18% NaCl	-	-	-	-	-	-
Phát triển ở pH 4,4	+	+	+	+	+	+
Phát triển ở pH 9,6	-	+	-	-	-	+
Bổ sung 0,02% NaN_3 và 40% manitol	-	-	-	-	-	-
Bổ sung 0,04% NaN_3	-	-	-	-	-	+
Khả năng sinh indole	-	-	-	-	-	-

Chú thích: (+): phát triển; (-): không phát triển

Sự phát triển của 10 dòng vi khuẩn lactic trong các điều kiện khác nhau (Bảng 4) được so sánh với phương pháp phân loại ở mức độ giống vi khuẩn lactic của Axelsson (2004). Kết quả định danh được tổng hợp trong bảng 5.

Bảng 5: Kết quả định danh các dòng vi khuẩn lactic sinh bacteriocin

STT	Dòng phân lập	Hình thái		Phân loại
		Khuẩn lạc	Tế bào	
1	Anti	Trắng đục, bề mặt trơn lồi, bìa nguyên	Que ngắn	Giới: Bacteria Ngành: Firmicutes Lớp: Bacilli Chi: Lactobacillales Họ: Lactobacillaceae Giống: *Lactobacillus* Loài: *Lactobacillus acidophlilus*
2	Probio	Trắng đục, bề mặt trơn lồi, bìa nguyên	Que ngắn	
3	Lac3	Trắng đục, bề mặt trơn lồi, bìa nguyên	Que ngắn	
4	Zin	Trắng đục, bề mặt trơn lồi, bìa nguyên	Cầu kết đôi	Giới: Bacteria Ngành: Firmicutes Lớp: Bacilli Chi: Lactobacillales Họ: Streptococcaceae Giống: *Streptococcus* Loài: *Streptococcus thermophilus*
5	DC2114	Trắng đục, bề mặt trơn lồi, bìa nguyên	Cầu đơn	Giới: Bacteria Ngành: Firmicutes Lớp: Bacilli Chi: Lactobacillales Họ: Leuconostocaceae Giống: *Leuconostoc*
6	DC2113	Trắng đục, bề mặt trơn lồi, bìa nguyên	Cầu đôi	Giới: Bacteria Ngành: Firmicutes Lớp: Bacilli Chi: Lactobacillales Họ: Enterococcaceae Giống: *Enterococcus*
7	DC213	Trắng đục, bề mặt trơn lồi, bìa nguyên	Que ngắn hơi cong	Giới: Bacteria Ngành: Firmicutes Lớp: Bacilli Chi: Lactobacillales Họ: Lactobacillaceae Giống: *Lactobacillus*
8	DC2132	Trắng đục, bề mặt trơn lồi, bìa nguyên	Que ngắn	
9	DC213A	Trắng đục, bề mặt trơn lồi, bìa nguyên	Que ngắn	
10	DC2112D	Trắng đục, bề mặt trơn lồi, bìa chia thùy	Que ngắn hơi cong	

4 KẾT LUẬN

Từ 7 loại sản phẩm thực phẩm lên men và 6 loại sản phẩm men tiêu hóa đã phân lập thu được 46 dòng vi khuẩn có các đặc tính thuộc hệ vi khuẩn lactic: Gram dương, catalase và oxydase âm tính, không có nội bào tử và có khả năng sinh phân giải $CaCO_3$. Kết quả khảo sát tính kháng khuẩn bằng hai phương pháp *"nhỏ giọt"* và *"khuếch tán trên giếng thạch"*, có 23 dòng biểu hiện tính kháng vi khuẩn, trong

đó 10 dòng có khả năng sinh bacteriocin kháng lại vi khuẩn chỉ thị *Bacillus subtilis* và dòng DC213A biểu hiện tính kháng khuẩn mạnh nhất. 10 dòng có tính kháng khuẩn của bacteriocin được tuyển chọn định danh. Dòng DC2114 thuộc giống *Leuconostoc*, dòng DC2113 thuộc giống *Enterococcus* và bốn dòng DC213, DC213A, DC2132, DC2112D thuộc giống *Lactobacillus*. Có 3 dòng vi khuẩn từ các sản phẩm men tiêu hóa Antibio, Probio và Lac3 thuộc loài *Lactobacillus acidophilus* và một dòng từ men Zincibio thuộc loài *Streptococcus thermophilus.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Abee, Tjakko, G. Beldman, B. Broek, J. Houben, R. Nout., F. Rombouts, S. Schoustra, F. Voragen, J. Wouters, A. Noomen, P. Walstra. 1999. Food fermentation part 1, Department of Food Technology and Nutritional Sciences, Wageningen Agriculture University.

Axelsson, Lars. 2004. Acid lactic Bacteria: Classification and Physiology. Acid lactic Bacteria microbiological and Functional Aspects. Third Edition, Revised and Expanded MATFORSK, Norwegian Food Research Institute, A°s, Norway, 19-67.

Herna´ndez, D., E. Cardell và V. Za´rate. 2004. Antimicrobial activity of acid lactic bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. Journal of Applied Microbiology, 99, 77-84.

Onda, Takumi, F. Yanagida, M. Tsufi, S. Ogino và T. Shinohara 1999. Isolation ang characterization of acid lactic bacteria strain GM005 producing antibacterial substance from *Miso*-paste product. Food Science Technology, the Yamnashi Industrial Technology Center. 5(3), 247-250.

Ouwehand, Arthur và Satu Vesterlund. 2004. Antimicrobial Components from Acid lactic Bacteria. Acid lactic bacteria. University of Turku, Finland, 375-397.

Comment [U1]: Ghi day du cac tac gia ra!

Comment [U2]: Liet ke!