

Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn acetic chịu nhiệt từ hạt ca cao lên men

Huỳnh Xuân Phong¹, Nguyễn Minh Tiến¹, Nguyễn Ngọc Thanh¹, Toshiharu Yakushi², Kazunobu Matsushita², Ngô Thị Phương Dung¹, Bùi Hoàng Đăng Long^{1*}

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

²Khoa Nông nghiệp, Đại học Yamaguchi, Nhật Bản

Ngày nhận bài 23/8/2019; ngày chuyển phản biện 26/8/2019; ngày nhận phản biện 26/9/2019; ngày chấp nhận đăng 1/11/2019

Tóm tắt:

Vi khuẩn acetic có vai trò quan trọng trong quá trình lên men acid acetic nhằm sản xuất nhiều sản phẩm có ích trong công nghiệp và đời sống. Nghiên cứu nhằm mục đích phân lập và tuyển chọn vi khuẩn acetic có khả năng chịu nhiệt và lên men acid từ ca cao. Các chủng vi khuẩn phân lập được đánh giá khả năng sinh acid và chịu nhiệt đến 43°C. Các chủng tuyển chọn được định danh đến mức độ loài bằng kỹ thuật sinh học phân tử. Kết quả đã phân lập được 16 chủng vi khuẩn acetic (AAB) từ 7 mẫu hạt ca cao lên men ở Bến Tre và Tiền Giang. Sơ tuyển được 10 chủng có đường kính vùng sáng trong khoảng 19-23 mm sau 48 giờ ủ ở 37°C trên môi trường bromocresol green ethanol agar. Kết quả cho thấy cả 10 chủng phân lập đều có khả năng phát triển ở nhiệt độ 43°C trên môi trường YPGD chứa 4% (v/v) ethanol. Tuyển chọn được 3 chủng AAB chịu nhiệt có khả năng lên men acid tốt là BT1H, BT2B1 và TG1D1 với nồng độ acid acetic đạt được sau 5 ngày lên men ở 37°C lần lượt là 4,45; 3,95 và 3,85% (w/v). Chủng BT2B1 được định danh là *Acetobacter pasteurianus*, chủng BT1H và TG1D1 được xác định là *Acetobacter tropicalis*.

Từ khóa: *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter tropicalis*, phân lập, tuyển chọn vi khuẩn acetic chịu nhiệt.

Chỉ số phân loại: 2.8

Đặt vấn đề

Acid acetic là nguyên liệu được sử dụng phổ biến cho các ngành công nghiệp thực phẩm như sản xuất giấm, rau quả muối chua, công nghiệp nhuộm, in, chế biến mùn cao su, công nghiệp tổng hợp hữu cơ. Từ hàng thế kỷ trước, lên men acid acetic hay còn gọi là lên men giấm đã được biết là quá trình lên men tự nhiên từ dịch chứa ethanol bởi một nhóm vi khuẩn lên men acid acetic rất quan trọng được gọi chung là vi khuẩn acid acetic (acetic acid bacteria - AAB) [1].

Các vi khuẩn lên men acid acetic đầu tiên được phát hiện là *Acetobacter aceti* (Beijerinck năm 1898) và *Gluconobacter suboxydans* (Kluyver và de Leeuw năm 1924) và được gọi chung là nhóm vi khuẩn acid acetic (AAB) [2]. Hiện nay, các nhà khoa học đã phân loại nhóm AAB thuộc họ Acetobacteraceae với 10 giống: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Acidomonas*, *Gluconacetobacter*, *Asaia*, *Kozakia*, *Swaminathania*, *Saccharibacter*, *Neosasaia* và *Granulibacter* [3, 4]. Trong đó, *Acetobacter* và *Gluconobacter* được sử dụng lên men acid acetic phổ biến nhất vì chúng có khả năng oxy hóa rượu tạo acid acetic với nồng độ cao.

Trong những năm gần đây, việc gia tăng nhiệt độ toàn cầu dẫn đến một số thách thức nghiêm trọng trong việc lên men với quy mô công nghiệp vì những hệ thống làm lạnh lớn tiêu tốn quá nhiều năng lượng để giữ ở nhiệt độ tối ưu. Nhiệt độ thích hợp cho quá trình lên men acid acetic trong khoảng 30°C và quá trình lên men này luôn được giữ ổn định để đảm bảo quá trình lên men tối ưu. Nhiệt độ gia tăng thêm chỉ khoảng 2-3°C cũng là nguyên nhân gây bất lợi không chỉ cho mức độ lên men mà còn ảnh hưởng đến hiệu quả lên men [2, 5]. Vì vậy, việc phân lập và tuyển chọn các dòng vi khuẩn chịu nhiệt lên men acid acetic thu hút nhiều sự quan tâm của các nhà khoa học [2, 6-8]. Qua đó có thể tiến tới một quy trình sản xuất giấm và các sản phẩm lên men từ AAB ở quy mô công nghiệp, mang lại hiệu quả kinh tế cao cho nhà sản xuất và giảm giá thành cho người tiêu dùng. Bên cạnh đó, việc phân lập và định danh các dòng AAB cũng góp phần làm phong phú thêm nguồn đa dạng sinh học, đặc biệt là nguồn vi sinh vật.

Quá trình lên men ca cao có sự tham gia đầu tiên của nấm men, sau đó là vi khuẩn và nhiệt độ trong thùng ủ thay đổi trong quá trình ủ, trong đó có sự tham gia của vi khuẩn acetic chuyển hóa rượu thành acid acetic [9]. Sản phẩm ca cao lên men tốt nhất ở nhiệt độ khá cao, đến 40-45°C [10].

*Tác giả liên hệ: bhdlong@ctu.edu.vn

Isolation and selection of thermotolerant acetic acid bacteria from fermented cocoa beans

Xuan Phong Huynh¹, Minh Tien Nguyen¹,
Ngoc Thanh Nguyen¹, Toshiharu Yakushi²,
Kazunobu Matsushita², Thi Phuong Dung Ngo¹,
Hoang Dang Long Bui^{1*}

¹Biotechnology Research and Development Institute, Can Tho University

²Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Japan

Received 23 August 2019; accepted 1 November 2019

Abstract:

Acetic acid bacteria (AAB) play an important role in the acetic acid fermentation in order to manufacture many useful products. The aim of this study was to isolate and select the thermotolerant acetic acid bacteria from fermented cocoa beans with high acid production. Acid acetic bacterial isolates were evaluated the acid production capacity and thermotolerant ability up to 43°C. The selected isolates were identified at species level using molecular techniques. As the result, 16 strains of AAB were isolated from 7 samples of fermented cocoa beans collected from Ben Tre and Tien Giang provinces. Ten isolates had high acid-producing yield with the diameter of yellow zone (19-23 mm) after 48 hours at 37°C on the bromocresol green ethanol agar medium. These 10 isolates could also grow at 43°C on the YPGD agar medium (added with 4.0% (v/v) of ethanol). Three thermotolerant isolates including BT1H, BT2B1, and TG1D1 were selected due to their good performances during fermentation with the concentrations of total acid produced at 4.45, 3.95, and 3.85% (w/v) respectively after 5 days of fermentation at 37°C. The isolate BT2B1 was identified as *Acetobacter pasteurianus* while BT1H and TG1D1 were *Acetobacter tropicalis*.

Keywords: *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter tropicalis*, isolation, selection of thermotolerant acetic acid bacteria.

Classification number: 2.8

Vấn đề ẩm lên toàn cầu đang ảnh hưởng lớn đến các quá trình chuyển hóa sinh học, đặc biệt là lên men acid acetic do vi khuẩn acid acetic rất nhạy cảm với nhiệt độ (tối ưu ở 30°C [2]). Từ đó cho thấy quá trình lên men cao ở nhiệt độ khá cao là nguồn tiềm năng để có thể phân lập các loài vi khuẩn acetic chịu nhiệt. Nghiên cứu này nhằm phân lập, tuyển chọn và xác định hình thái, đặc điểm sinh hóa của các chủng vi khuẩn acid acetic chịu nhiệt được phân lập từ cao lên men.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên vật liệu và hóa chất

Mẫu hạt cao lên men tại thời điểm 2-4 ngày của quá trình lên men được thu về từ tỉnh Bến Tre, Tiền Giang và được trữ ở nhiệt độ 2-8°C. Môi trường YPGD (yeast extract 5 g/l, peptone 5 g/l, glycerol 5 g/l, D-glucose 5 g/l) và môi trường PM (5 g/l D-glucose, 20 g/l glycerol, 10 g/l yeast extract, 10 g/l peptone, 10% (v/v) dịch trích khoai tây) [8]. Môi trường bromocresol green ethanol agar (ethanol 0,2%, yeast extract 0,3%, bromocresol green 0,01%) [8]. Các hóa chất khác: CaCO₃, ethanol, phenolphthalein, NaOH... của Merck (Đức) và HiMedia Laboratories (Ấn Độ).

Phương pháp nghiên cứu

Phân lập và xác định đặc điểm hình thái và sinh hóa vi khuẩn acetic:

Cân 5 g mẫu cho vào bình tam giác có sẵn 50 ml nước cất vô trùng và pha loãng mẫu ở các nồng độ 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ và 10⁻⁵. Sau đó, cấy trải trên môi trường YPGD agar có bổ sung 4% (v/v) ethanol, 2% (w/v) agar và 0,5% (w/v) CaCO₃. Ủ hiếu khí ở 37°C trong 24-48 giờ [2]. Quan sát và lựa chọn các khuẩn lạc tạo vòng halo trên môi trường là AAB. Khuẩn lạc AAB sẽ tạo vòng sáng xung quanh vì vi khuẩn này tạo ra acid acetic hòa tan CaCO₃ làm mất màu trắng đục của CaCO₃. Tiếp theo, cấy chuyển nhiều lần để thu được chủng AAB thuần với các tế bào đồng nhất. Quan sát hình dạng, đo kích thước tế bào và khuẩn lạc. Thực hiện nhuộm Gram, thử nghiệm catalase và oxidase.

Khảo sát khả năng sinh acid acetic của các chủng vi khuẩn acetic:

Tăng sinh các chủng AAB trong ống nghiệm chứa môi trường YPGD trong 24 giờ ở 37°C trong điều kiện hiếu khí. Nhỏ 1 giọt dung dịch nuôi cấy lên giữa đĩa môi trường thạch màu xanh chứa bromocresol green ethanol agar (ethanol 0,2%, yeast extract 0,3%, bromocresol green 0,01%) và ủ hiếu khí ở 37°C trong 24 giờ. Đo và so sánh các vòng màu vàng sinh ra xung quanh AAB sau 24 giờ và 48 giờ [8, 11]. Thử nghiệm được thực hiện 3 lần để lấy giá trị trung bình và các chủng có khả năng sinh acid tốt sẽ được lựa chọn để thử khả năng chịu nhiệt.

Đánh giá khả năng chịu nhiệt của các chủng AAB:

Cây chuyển các chủng AAB được tuyển chọn vào môi trường YPGD chứa 4% (v/v) ethanol. Ủ hiếu khí ở các mức nhiệt độ 35, 37, 39, 41 và 43°C. Theo dõi và đánh giá sự phát triển của các chủng AAB sau 2 và 3 ngày như sau: phát triển mạnh (đường cấy đậm và liên tục), phát triển trung bình (đường cấy nhạt và liên tục, hoặc đậm và đứt quãng), phát triển yếu (đường cấy nhạt và đứt quãng) [8, 11].

Tuyển chọn chủng AAB chịu nhiệt có khả năng sinh acid cao:

Mục đích nhằm tuyển chọn các chủng AAB lên men mạnh có khả năng phát triển tốt ở nhiệt độ cao. Nuôi ủ các chủng AAB trong ống nghiệm chứa 5 ml môi trường YPGD trong 48 giờ, lắc 150 vòng/phút ở 30°C. Rút 1 ml dịch tăng sinh cho vào 99 ml môi trường YPGD (bổ sung 4% (v/v) ethanol) và ủ lắc ở 35, 37 và 39°C [11, 12]. Xác định hàm lượng acid sinh ra mỗi ngày trong 7 ngày bằng phương pháp chuẩn độ sử dụng NaOH 0,1 N. So sánh và tuyển chọn các chủng AAB có khả năng lên men acid tốt nhất.

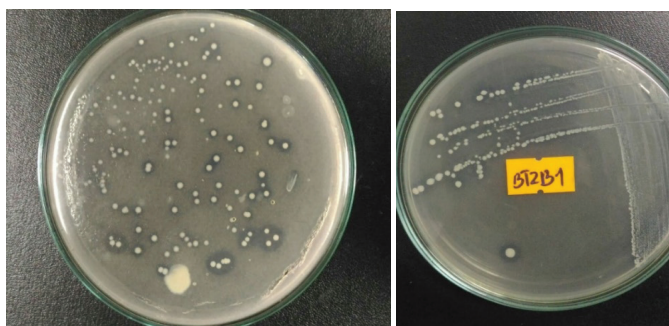
Định danh các chủng AAB chịu nhiệt được tuyển chọn:

Các chủng AAB tuyển chọn được ly trích DNA và định danh với cặp mồi để khuếch đại trình tự vùng bảo tồn trên 16S rDNA của nhóm α -Proteobacteria: 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1525R (5'-AAAGGAGGTGATCCAGCC-3') [8]. Sản phẩm PCR được giải trình tự sử dụng hệ thống giải trình tự ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, USA). Dựa trên trình tự 16S rDNA để phân tích và so sánh với trình tự các chủng vi khuẩn trên ngân hàng dữ liệu NCBI.

Kết quả và thảo luận

Phân lập tuyển chọn chủng AAB

Mười sáu chủng AAB đã được phân lập từ 7 mẫu hạt ca cao lên men ở Bến Tre và Tiền Giang. Các khuẩn lạc AAB tạo vòng halo trên môi trường YPGD agar bổ sung 4% (v/v) ethanol và 0,5% CaCO₃ (hình 1). Kết quả nhuộm Gram, thử nghiệm oxidase, catalase các chủng vi khuẩn phân lập được tổng hợp ở bảng 1.



Hình 1. Khẩn lạc trên môi trường YPGD agar (bổ sung 0,5% CaCO₃).

Bảng 1. Ký hiệu chủng phân lập và các đặc tính cơ bản của 16 chủng AAB.

Nguồn phân lập	STT	Chủng	Nhuộm Gram	Oxidase	Catalase
Xã An Khánh, Châu Thành, Bến Tre	1	BT1G	Gram âm	-	+
	2	BT1H	Gram âm	-	+
	3	BT1K1	Gram âm	-	+
Xã Phú Mỹ, Châu Thành, Bến Tre	4	BT2G	Gram âm	-	+
	5	BT2A2	Gram âm	-	+
	6	BT2E	Gram âm	-	+
	7	BT2F	Gram âm	-	+
	8	BT2B2	Gram âm	-	+
	9	BT2K	Gram âm	-	+
	10	BT2B1	Gram âm	-	+
	11	BT2H	Gram âm	-	+
	12	BT2C2	Gram âm	-	+
	13	BT2A1	Gram âm	-	+
Xã Hội Xuân, Cai Lậy, Tiền Giang	14	TG1C2	Gram âm	-	+
	15	TG1D1	Gram âm	-	+
Phường 10, TP. Mỹ Tho, Tiền Giang	16	TG2B	Gram âm	-	+

Tất cả 16 chủng AAB đều cho kết quả Gram âm vì tế bào có màu đỏ sau khi nhuộm với thuốc nhuộm safaranin. Tất cả 16 chủng AAB đều cho kết quả oxidase âm tính (thuốc thử không bị oxy hóa thành màu xanh dương của indolphenol) [13]. Tất cả 16 chủng AAB cho kết quả dương tính do có enzyme catalase, thủy phân H₂O₂ thành H₂O và O₂. Từ kết quả nhuộm Gram, thử nghiệm oxidase và catalase thu được cho thấy các chủng phân lập phù hợp với các đặc điểm điển hình của AAB [14].

Khả năng sinh acid acetic của các chủng AAB phân lập

Khả năng sinh acid của các chủng AAB được đánh giá bằng đường kính vòng sáng màu vàng xung quanh khuẩn lạc. Kết quả cho thấy kích thước vòng sáng của 16 chủng AAB ở thời điểm 24 giờ không có sự khác biệt về mặt thống kê (bảng 2). Tuy nhiên, kích thước vòng sáng của 16 chủng AAB ở thời điểm 48 giờ có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê. Trong đó, 10 chủng AAB được sơ tuyển với kích thước vòng sáng từ 19 mm trở lên ở thời điểm 48 giờ được đánh giá có khả năng sinh acid mạnh hơn 6 chủng còn lại. Do đó, 10 chủng được sơ tuyển để đánh giá khả năng chịu nhiệt.

Bảng 2. Khả năng sinh acid acetic của 16 chủng AAB.

STT	Chủng	Kích thước vòng sáng (mm)	
		Sau 24 giờ	Sau 48 giờ
1	BT1G	9,33 ^{cde}	17,0 ^{abc}
2	BT1H	9,0 ^{bcd}	19,33 ^d
3	BT1K1	8,0 ^{ab}	16,33 ^{ab}
4	BT2A1	9,33 ^{cde}	19,33 ^d
5	BT2A2	10,0 ^{de}	21,0 ^e
6	BT2B1	10,0 ^{de}	21,0 ^e
7	BT2B2	8,67 ^{bc}	17,33 ^{bc}
8	BT2C2	8,67 ^{bc}	17,67 ^c
9	BT2E	10,0 ^{de}	21,0 ^e
10	BT2F	8,0 ^{ab}	19,0 ^d
11	BT2G	8,0 ^{ab}	16,0 ^a
12	BT2H	7,33 ^a	16,0 ^a
13	BT2K	11,33 ^f	21,67 ^c
14	TG1C2	10,33 ^{ef}	19,0 ^d
15	TG1D1	11,33 ^f	23,0 ^f
16	TG2B	9,67 ^{cde}	19,33 ^d

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 thống kê ở mức độ tin cậy 95%.

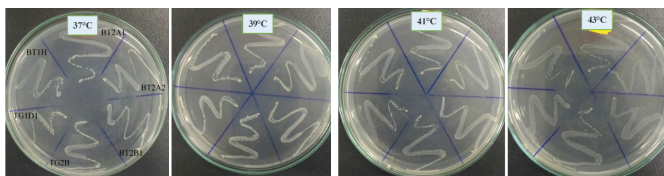
Khả năng chịu nhiệt của các chủng AAB

Mười chủng AAB đã sơ tuyển được cấy vào môi trường YPGD có bổ sung 4% (v/v) ethanol và ủ ở các mức nhiệt độ 37, 39, 41 và 43°C. Kết quả thử nghiệm khả năng chịu nhiệt cho thấy, sự phát triển khuẩn lạc trên môi trường YPGD có bổ sung 4% (v/v) ethanol của 10 chủng AAB không có sự khác biệt sau 48 giờ và 72 giờ (bảng 3). Sau 48 giờ ủ, tất cả các chủng đều phát triển ở 37, 39, 41 và 43°C (hình 2). Ở 37°C, tất cả 10 chủng phát triển mạnh; ở 39°C có 7 chủng phát triển mạnh, 3 chủng (BT2F, BT2K và BT2A1) phát triển trung bình; ở 41°C chủng BT1H phát triển mạnh, 9 chủng còn lại phát triển trung bình; ở 43°C có 5 chủng phát triển trung bình, 5 chủng phát triển yếu. So với nghiên cứu gần đây của Huỳnh Thị Hoàng Anh [12], chủng B2-3 chỉ phát triển tốt ở 37°C, còn chủng B3-2 phát triển tốt ở 37 và 39°C nhưng cả hai chủng không phát triển ở 43°C sau 48 giờ ủ. Từ đó cho thấy, 10 chủng AAB được sơ tuyển trong nghiên cứu này có khả năng chịu nhiệt cao hơn so với 2 chủng B2-3 và B3-2.

Bảng 3. Kết quả thử nghiệm khả năng chịu nhiệt ở 37, 39, 41 và 43°C.

STT	Chủng	Sau 48 giờ				Sau 72 giờ			
		37°C	39°C	41°C	43°C	37°C	39°C	41°C	43°C
1	BT1H	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++
2	BT2A2	+++	+++	++	+	+++	+++	++	+
3	BT2E	+++	+++	++	+	+++	+++	++	+
4	BT2F	+++	++	++	+	+++	++	++	+
5	BT2K	+++	++	++	++	+++	++	++	++
6	BT2B1	+++	+++	++	++	+++	+++	++	+
7	BT2A1	+++	++	++	++	+++	++	++	++
8	TG1C2	+++	+++	++	+	+++	+++	++	+
9	TG1D1	+++	+++	++	+	+++	+++	++	+
10	TG2B	+++	+++	++	++	+++	+++	++	++

Ghi chú: (+) phát triển yếu, (++) phát triển trung bình, (+++) phát triển mạnh.

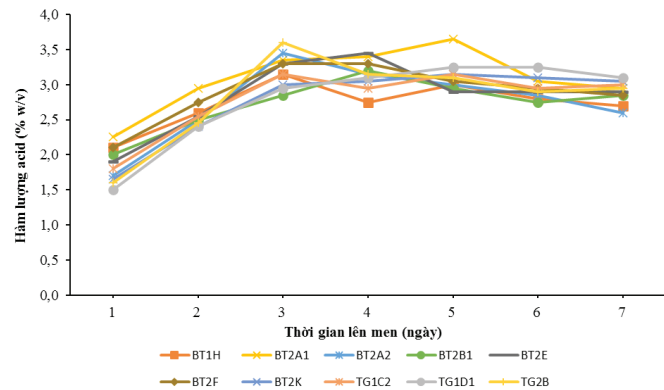


Hình 2. Sự phát triển của AAB ở 37, 39, 41 và 43°C (môi trường YPGD, 48 giờ).

Tuyển chọn chủng AAB chịu nhiệt có khả năng sinh acid tốt

Biểu đồ hàm lượng acid của 10 chủng AAB ở 35°C cho thấy khả năng sinh acid của các chủng tương đối đều nhau, tăng dần từ ngày 1 đến ngày 5 và có khuynh hướng giảm sau đó (hình 3). Tất cả 10 chủng đều tăng trong 3 ngày đầu lên men, đáng chú ý là chủng TG2B đạt hàm lượng acid cao nhất ở mức 3,60% (w/v) chỉ trong 3 ngày lên men, trong khi các chủng còn lại đạt giá trị acid cao nhất là ở ngày 4 hoặc ngày 5. Trong đó, chủng BT2A1 có lượng acid đạt cao nhất

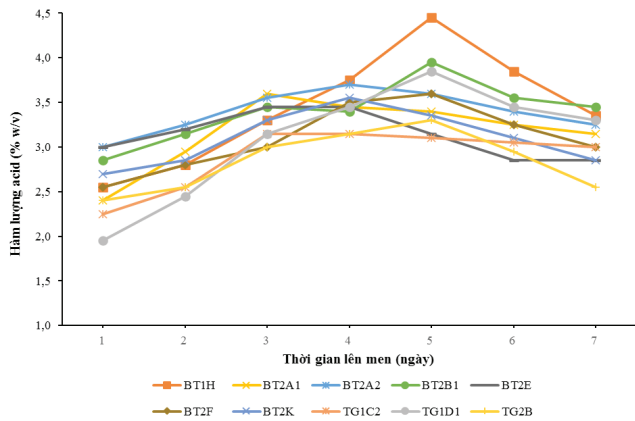
ở ngày 5 với hàm lượng acid là 3,65% (w/v) và chủng BT2E đạt hàm lượng acid cao nhất là ở ngày lên men thứ 4 (đạt được 3,45% (w/v)).



Hình 3. Hàm lượng acid acetic của 10 chủng AAB ở 35°C.

Hàm lượng acid sinh ra của các chủng BT1H, BT2A2, BT2F, TG1C2 và TG2B tăng từ ngày 1 đến ngày 3 (lần lượt là 3,15; 3,45; 3,30; 3,15 và 3,60% (w/v)) và đều giảm sau đó nhưng hàm lượng acid ở ngày thứ 5 vẫn duy trì ở mức trên 3,0% (w/v) (trong khoảng 3,0-3,15% (w/v)). Ba chủng BT2B1, BT2E và TG1D1 tăng khá đều từ ngày 1 đến ngày 4 (lần lượt là 3,20; 3,45 và 3,25% (w/v)) và cũng giảm sau đó, hàm lượng acid ở ngày 5 trong khoảng 2,85-2,95% (w/v). Nồng độ acid acetic có sự giảm là do một số loài AAB không chỉ có khả năng oxy hóa ethanol thành acid acetic mà còn có thể tiếp tục oxy hóa acid acetic thành nước và CO₂ [8]. Chủng BT2A1 có giá trị hàm lượng acid cực đại với 3,65% (w/v) ở ngày thứ 5 và cao nhất so với giá trị hàm lượng acid cực đại của các chủng còn lại. So với hàm lượng acid của 2 chủng đã tuyển chọn từ nghiên cứu của Huỳnh Thị Hoàng Anh [12] là B2-3 (4,44%) và B3-2 (5,08%) thì hàm lượng acid của chủng BT2A1 ở ngày thứ 5 thấp hơn khá nhiều nhưng cao hơn 2 chủng C2 (3,56%) và NH2 (3,44%) đã được tuyển chọn từ nghiên cứu của Nguyễn Thị Ngọc Giao [15].

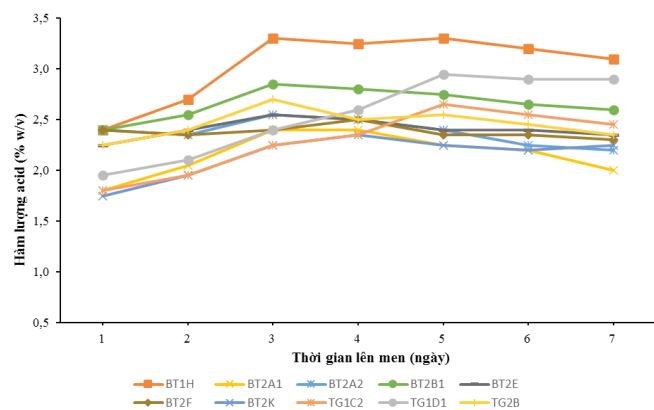
Kết quả từ biểu đồ hình 4 cho thấy, hầu hết 10 chủng AAB đều có khả năng sinh acid khá tương đồng ở 37°C. Cụ thể, hàm lượng acid đều tăng theo thời gian lên men và đạt giá trị cực đại trong khoảng 3 đến 5 ngày lên men. Chủng BT1H, BT2B1, BT2F, TG1D1 và TG2B có hàm lượng acid đạt cao nhất ở ngày 5 lần lượt là 4,45; 3,95; 3,60; 3,85 và 3,30% (w/v). Hàm lượng acid của chủng BT2A1 tối đa đạt được vào ngày lên men thứ 3, đạt mức 3,45% (w/v), sau đó giảm nhưng vẫn duy trì ở mức 3,40% (w/v) vào ngày lên men thứ 5. Bốn chủng BT2A2, BT2E, BT2K và TG1C2 có hàm lượng acid đạt cao nhất vào ngày lên men thứ 4 (lần lượt là 3,70; 3,45; 3,55 và 3,15% (w/v)). Hàm lượng acid của 4 chủng này giảm nhẹ ở ngày lên men thứ 5, đạt lần lượt ở mức 3,60; 3,15; 3,35 và 3,10% (w/v).



Hình 4. Hàm lượng acid acetic của 10 chủng AAB ở 37°C.

Kết quả cho thấy 3 chủng BT1H, BT2B1 và TG1D1 có hàm lượng acid ở ngày 5 đạt cao nhất, lần lượt là 4,45; 3,75 và 3,85% (w/v), cao hơn so với giá trị hàm lượng acid của các chủng còn lại ở ngày 5 (chỉ trong khoảng 3,30-3,70% (w/v)). So với 2 chủng B2-3 và B3-2 đã được tuyển chọn từ nghiên cứu của Huỳnh Thị Hoàng Anh [12], chủng BT1H với 4,45% (w/v) ở ngày 5 khá tương đồng với chủng B2-3 (4,44%) nhưng lại thấp hơn chủng B3-2 (5,08%); chủng BT2B1 và TG1D1 có hàm lượng acid ở ngày 5 thấp hơn 2 chủng B2-3 và B3-2. Tuy nhiên, hàm lượng acid ngày 5 của 3 chủng BT1H, BT2B1 và TG1D1 cao hơn nhiều so với 2 chủng C2 (3,56%) và NH2 (3,44%) theo nghiên cứu của Nguyễn Thị Ngọc Dao [15].

Hàm lượng acid của 10 chủng AAB ở 39°C trong 7 ngày lên men khá ổn định nhưng thấp hơn so với khi lên men ở 35 và 37°C (hình 5). Cụ thể, hàm lượng acid của các chủng AAB tuy có tăng trong quá trình lên men nhưng chỉ đạt dưới 3,0% (w/v) sau 7 ngày lên men (2,20-2,95%). Riêng chủng BT1H vẫn có khả năng duy trì khả năng sinh acid tốt nhất, đạt 3,3% (w/v) vào ngày lên men thứ 3 và duy trì đến ngày lên men thứ 5. Tuy hai chủng BT2B1 và TG1D1 chỉ đạt hàm lượng acid tối đa là 2,85% (ngày 3) và 2,95% (ngày 5) nhưng cũng cho thấy khả năng chịu nhiệt và sinh acid tốt hơn so với các chủng còn lại.

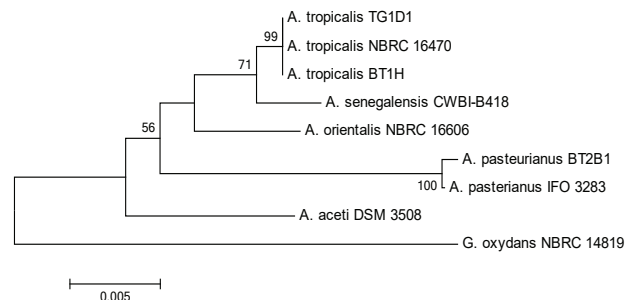


Hình 5. Hàm lượng acid acetic của 10 chủng AAB ở 39°C.

Như vậy, chủng BT1H, BT2B1, TG1D1 (ở 37°C) và BT2A1 (ở 35°C) là 4 chủng có khả năng lên men tốt nhất với hàm lượng acid ở ngày thứ 5 lần lượt là 4,45; 3,95; 3,85 và 3,65% (w/v). Từ các kết quả trên, nghiên cứu đã tuyển chọn được 3 chủng có khả năng sinh acid ở nhiệt độ 37°C tốt nhất là BT1H, BT2B1 và TG1D1 cũng như vẫn còn khả năng sinh acid ở 39°C. Hàm lượng acid của 3 chủng tuyển chọn cao hơn so với chủng C2 (3,56%) và NH2 (3,44%) ở 37°C [15]. Kết quả cho thấy, các chủng phân lập được từ ca cao lên men có khả năng chịu nhiệt tốt và duy trì khả năng lên men tốt hơn ở nhiệt độ cao là do bản thân các chủng này có nguồn gốc từ quá trình lên men ca cao ở nhiệt độ khá cao (40-45°C, thậm chí lên đến 50°C) [10]. Từ đó cho thấy tiềm năng khai thác và ứng dụng các chủng AAB chịu nhiệt này trong các quá trình lên men acid acetic mà không chịu sự tác động lớn khi nhiệt độ khối lên men gia tăng nên sẽ giảm được chi phí làm mát, giảm chi phí vận hành hệ thống lên men.

Định danh các chủng AAB được tuyển chọn

Ba chủng BT1H, BT2B1 và TG1D1 có khả năng lên men tốt nhất ở 37°C cũng như duy trì khả năng lên men tốt ở 39°C được định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử thông qua kỹ thuật khuếch đại và giải trình tự gen vùng bảo tồn trên 16S rDNA của nhóm α -Proteobacteria. Kết quả so sánh mức độ tương đồng trình tự DNA của ba chủng BT1H, BT2B1 và TG1D1 với trình tự của các chủng vi khuẩn acetic trong ngân hàng gene trên NCBI cho thấy, chủng BT2B1 được định danh là *Acetobacter pasteurianus*, chủng BT1H và TG1D1 được xác định là *Acetobacter tropicalis* với mức độ tương đồng so sánh BLAST trên cơ sở dữ liệu NCBI đạt 98,7-99,8%. Cây phân loài ở hình 6 (sử dụng chương trình MEGA 6 với chỉ số bootstrap 1.000) của 3 chủng phân lập cho thấy mối quan hệ di truyền rất gần so với các loài đã định danh trong chi *Acetobacter*.



Hình 6. Cây phân loài di truyền của 3 chủng AAB chịu nhiệt được tuyển chọn.

Đặc điểm về hình thái khuẩn lạc và tế bào cũng như một số đặc điểm sinh hóa cơ bản của 3 chủng phân lập BT1H, BT2B1 và TG1D1 được trình bày ở bảng 4. Các đặc điểm cơ bản phù hợp với mô tả của loài *A. pasteurianus* và *A. tropicalis* trong tài liệu phân loại vi khuẩn Bergey [14]. Hai

loài này cũng được phân lập và đánh giá là các loài có khả năng chịu nhiệt và lên men acid acetic tốt ở nhiệt độ 37°C [2, 15, 16].

Bảng 4. Đặc điểm hình thái và sinh hóa của 3 chủng AAB chịu nhiệt được tuyển chọn.

STT	Chủng	Khảo sát sau 48 giờ	Tế bào		Đặc điểm sinh hóa			
		Hình dạng	Đường kính (mm)	Hình dạng	Kích thước (μm)	Gram	Oxidase	Catalase
1	BT1H	Tròn, trơn, mờ, bìa nguyên, trắng ngà	2,0-2,5	Que ngắn	0,5-0,7 x 1,8-2,4	-	-	+
2	BT2B1	Tròn, trơn, mờ, bìa nguyên, trắng đục	2,0-2,5	Que ngắn	0,4-0,6 x 1,8-2,2	-	-	+
3	TG1D1	Tròn, trơn, mờ, bìa nguyên, trắng ngà	2,0-2,5	Que ngắn	0,4-0,7 x 1,8-2,4	-	-	+

Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập được 16 chủng AAB từ 7 mẫu hạt ca cao lên men được thu về từ Bến Tre và Tiền Giang. Sơ tuyển được 10 chủng AAB là BT1H, BT2A1, BT2A2, BT2B1, BT2E, BT2F, BT2K, TG1C2, TG1D1 và TG2B có đường kính vòng sáng từ 19 mm trở lên sau 48 giờ ủ ở 37°C. Tất cả 10 chủng AAB đã sơ tuyển có khả năng chịu nhiệt ở 43°C. Kết quả đã tuyển chọn được 3 chủng AAB chịu nhiệt có khả năng lên men acid acetic tốt ở 37°C là BT1H, BT2B1 và TG1D1 thuộc giống *Acetobacter* với nồng độ acid acetic đạt được trong ngày lên men thứ 5 trong khoảng 3,85-4,45% (w/v).

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí từ Chương trình Công nghệ sinh học tiên tiến Trường Đại học Cần Thơ và Chương trình CCP (Core-to-Core Program, 2014-2019).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Lương Đức Phẩm (1998), *Công nghệ vi sinh vật*, Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- [2] A. Saeki, G. Theeragool, K. Matsushita, H. Toyama, N. Lotong, O. Adachi (1997), "Development of thermotolerant acetic acid bacteria useful for Vinegar Fermentation at higher temperatures", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **61(1)**, pp.138-145.
- [3] Y. Jojima, Y. Mihara, S. Suzuki, K. Yokozeki, S. Yamanaka, and R. Fudou (2004), "*Saccharibacter floricola* gen. nov., sp. nov., a novel osmophilic acetic acid bacterium isolated from pollen", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54(6)**, pp.2263-2267.
- [4] D.E. Greenberg, S.F. Porcella, F. Stock, A. Wong, P.S. Conville, P.R. Murray, S.M. Holland, and A.M. Zelazny (2006), "*Granulibacter bethesdensis* gen. nov., sp. nov., a distinctive pathogenic acetic acid

bacterium in the family Acetobacteraceae", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **56(11)**, pp.2609-2616.

[5] S. Ohmori, H. Masai, K. Arima and T. Beppu (1980), "Isolation and identification of acetic acid bacteria for submerged acetic acid fermentation at high temperature", *Agricultural and Biological Chemistry*, **44(12)**, pp.2901-2906.

[6] D. Moonmangmee, O. Adachi, Y. Ano, E. Shinagawa, H. Toyama, G. Theeragool, N. Lotong, and K. Matsushita (2000), "Isolation and characterization of thermotolerant *Gluconobacter* strains catalyzing oxidative fermentation at higher temperatures", *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **64(11)**, pp.2306-2315.

[7] B. Ndoeye, S. Lebecque, R. Dubois-Dauphin, L. Tounkara, A.T. Guiro, C. Kere, B. Diarawa, and P. Thonart (2006), "Thermoresistant properties of acetic acid bacteria isolated from tropical products of Sub-Saharan Africa and destined to industrial vinegar", *Enzyme and Microbial Technology*, **39(4)**, pp.916-923.

[8] W. Kanchanarach, G. Theeragool, T. Yakushi, H. Toyama, A. Adachi, K. Matsushita (2010), "Characterization of thermotolerant *Acetobacter pasteurianus* strains and quinoprotein alcohol dehydrogenases", *Applied Microbial and Biotechnology*, **85(3)**, pp.741-751.

[9] R.F. Schwan, and A.E. Wheals (2004), "The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **44(4)**, pp.205-221.

[10] Vương Thanh Tùng và Hà Thanh Toàn (2006), "Khảo sát ảnh hưởng của quá trình ủ lên men đến chất lượng hạt ca cao", *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, **5**, tr.149-157.

[11] Huỳnh Xuân Phong, Nguyễn Mỹ Vi, Nguyễn Ngọc Thanh, Bùi Hoàng Đăng Long, Toshiharu Yakushi, Kazunobu Matsushita, Ngô Thị Phương Dung (2017), "Tuyển chọn vi khuẩn acetic chịu nhiệt ứng dụng trong lên men acid acetic", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, **20(9B)**, tr.44-49.

[12] Huỳnh Thị Hoàng Anh (2014), *Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn acid acetic chịu nhiệt từ ca cao*, Luận văn đại học ngành Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.

[13] Trần Linh Thuộc (2003), *Phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm*, Nhà xuất bản Giáo dục.

[14] M. Sievers and J. Swings (2005), "Genus I. *Acetobacter*", *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, **2**, pp.51-54.

[15] Nguyễn Thị Ngọc Giao (2014), *Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn acid acetic chịu nhiệt từ trái cây*, Luận văn đại học ngành Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.

[16] W. Kanchanarach, G. Theeragool, T. Inoue, T. Yakushi, O. Adachi, K. Matsushita (2010), "Acetic acid fermentation of *Acetobacter pasteurianus*: Relationship between acetic acid resistance and pellicle polysaccharide formation", *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **74(8)**, pp.1591-1597.