

XÁC ĐỊNH MỘT SỐ LOÀI VI KHUẨN LACTIC TRONG NƯỚC CHUA ĐẬU PHỤ TRUYỀN THỐNG

Trần Thị Thu Hằng^{1*}, Nguyễn Quang Đức², Lương Hồng Nga³

¹*Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*
²*Trung tâm Nghiên cứu và Kiểm tra chất lượng nông sản thực phẩm,*
Viện Cơ điện Nông nghiệp và Công nghệ sau thu hoạch
³*Trường Hóa và Khoa học Sự sống, Đại học Bách khoa Hà Nội*

*Tác giả liên hệ: tranhang.cntp@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 14.05.2025

Ngày chấp nhận đăng: 31.10.2025

TÓM TẮT

Nước chua từ quá trình lên men whey đậu phụ là tác nhân đông tụ tự nhiên được sử dụng phổ biến trong sản xuất đậu phụ truyền thống, góp phần tạo nên các đặc tính đặc trưng của sản phẩm như mềm, mát và mịn. Vi khuẩn lactic chiếm ưu thế trong quá trình lên men này. Nghiên cứu này nhằm phân lập, mô tả đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa, đồng thời định danh bằng sinh học phân tử đến mức độ loài một số vi khuẩn lactic có mặt trong quá trình lên men tự nhiên của whey đậu phụ. Có 28 chủng vi khuẩn lactic đã được phân lập trên môi trường MRS bổ sung CaCO₃, với đặc điểm điển hình là khuẩn lạc trắng đục, hình tròn và Gram (+), một số chủng có thể phát triển ở 45°C và sinh khí từ glucose. Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA cho thấy 2 chủng thuộc *Limosilactobacillus fermentum* và 3 chủng thuộc *Weissella confusa*.

Từ khóa: Whey đậu phụ, vi khuẩn lactic, nước chua, chất đông tụ protein.

Identification of Lactic Acid Bacteria in Traditional Fermented Tofu Whey

ABSTRACT

Acidic whey obtained from tofu whey fermentation is a natural coagulant commonly used in traditional tofu production, contributing to the characteristic properties of the product such as softness, coolness and smooth texture. Lactic acid bacteria predominate in this fermentation process. This study aimed to isolate and characterize the morphological, physiological, and biochemical properties, and by using molecular biology techniques identify to the species level of some lactic acid bacteria present in the natural fermentation of tofu whey. Twenty-eight lactic acid bacterial strains were isolated on MRS agar supplemented with CaCO₃, exhibiting typical opaque white, round colonies and Gram-positive staining, some strains were able to grow at 45°C and produced gas from glucose. The 16S rRNA gene sequencing identified two isolates as to *Limosilactobacillus fermentum* and three isolates as *Weissella confusa*.

Keywords: Tofu whey, lactic acid bacteria, acidic whey, protein coagulant.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đậu phụ là sản phẩm phổ biến được chế biến từ hạt đậu nành, giàu protein và từ lâu đã được sử dụng như một nguồn đạm thay thế cho thịt trong khẩu phần ăn của người phương Đông (Cai & Chang, 1998). Hàm lượng protein trong đậu phụ không chỉ cao (khoảng 7-16%) mà còn có giá trị dinh dưỡng tương đối hoàn chỉnh nhờ chứa đầy đủ 8 axit amin thiết yếu (Cai & Chang, 1998; Kudelka & cs., 2021). Bên cạnh đó, đậu phụ còn cung cấp chất béo và các

khoáng chất như canxi, đồng, selen, phospho... Đồng thời, sản phẩm này có hàm lượng calo thấp và hoàn toàn không chứa cholesterol, do đó được đánh giá là thực phẩm có lợi cho sức khỏe, giúp phòng ngừa béo phì, tiểu đường và các bệnh tim mạch (Chang, 2007).

Quy trình sản xuất đậu phụ bao gồm các công đoạn: ngâm, nghiền, lọc hạt đậu để thu được sữa đậu; sau đó gia nhiệt sữa đậu và bổ sung tác nhân đông tụ để thu được hoa đậu; bước cuối là ép hoa đậu để tạo thành bìa đậu phụ, đồng thời thu được nước trong (whey).

Trong quy trình này, đông tụ được coi là quá trình quan trọng, có ảnh hưởng lớn tới chất lượng đậu phụ (Rui & cs., 2016; Zhang & cs., 2013; Guan & cs., 2021). Các tác nhân đông tụ thường được sử dụng được chia thành hai nhóm chính: (1) nhóm muối như calcium sulfate, calcium chloride hoặc muối nigari - các ion Ca^{2+} hoặc Mg^{2+} trong các muối này giúp trung hòa điện tích âm trên bề mặt protein và hình thành cầu nối giữa các phân tử protein, tạo thành mạng gel (Wang & Damodaran, 1991; Guan & cs., 2021); (2) nhóm axit - các chất trong nhóm này cung cấp ion H^+ làm giảm pH dịch sữa đậu nành xuống điểm đẳng điện của protein, từ đó thúc đẩy quá trình kết tủa (Zhang & cs., 2013; Zhu & cs., 2016; Cao & cs., 2017; Guan & cs., 2021). Trong quá trình này, protein đậu nành kết tụ thông qua liên kết chéo protein-protein và protein-nước thành gel có cấu trúc tổ ong ngẫu nhiên hoặc đều đặn (Zhang & cs., 2013).

Nước chua (acidic whey) - thuộc nhóm axit - là tác nhân đông tụ truyền thống đã được sử dụng từ lâu đời tại các quốc gia như Trung Quốc, Việt Nam, Indonesia và Ấn Độ (Messina, 1997; Chang, 2007). Ở Việt Nam, nước chua đặc biệt phổ biến tại các làng nghề truyền thống nổi tiếng như làng Mơ - Mai Động (Hà Nội), Đại Cát (Hà Nội), Trà Lâm (Bắc Ninh) và Xuân Lôi (Hưng Yên). Tại đây, nước chua được tạo ra bằng cách lên men tự nhiên phần nước trong (whey) trong khoảng 16-24 giờ để đạt đến độ chua nhất định, sau đó được sử dụng làm tác nhân đông tụ cho mẻ sản xuất tiếp theo. Nước chua chứa các axit hữu cơ giúp hạ pH dịch sữa đậu nành về điểm đẳng điện (pI) khi kết hợp với nhiệt độ cao (85-95°C), từ đó thúc đẩy quá trình tạo gel protein, tức hoa đậu. Trong mạng gel protein này, nước, lipid và các thành phần hòa tan khác bị “bẫy” lại (Lê Ngọc Tú, 2001). pH của nước chua là yếu tố then chốt ảnh hưởng đến hiệu quả kết tủa protein: nếu pH cao, cần lượng nước chua lớn hơn; nếu pH quá thấp, hiệu suất thu hồi đạm giảm. Khoảng pH tối ưu được xác định là từ 4,5-5,0 (Hà Đức Hồ, 2005). So với các tác nhân đông tụ công nghiệp như calcium sulfate, calcium chloride hay muối nigari, nước chua cho sản phẩm đậu phụ có kết cấu mềm, mịn và hương vị đặc trưng hơn (Qiao & cs., 2010).

Theo Qiao & cs. (2010), whey đậu phụ chứa nhiều hợp chất hòa tan như protein, đường, vitamin và khoáng chất, là môi trường thuận lợi cho vi sinh vật phát triển, đặc biệt là vi khuẩn lactic - nhóm vi sinh vật chiếm ưu thế trong nước chua (Li & cs., 2017; Qiao & cs., 2010; Nguyễn Văn Dầu, 1984). Trong quá trình lên men, pH của whey giảm từ khoảng 6,5 xuống còn 4,0-5,0, đồng thời nồng độ axit hữu cơ - chủ yếu là axit lactic - đạt mức tối đa khoảng 10-11 g/l (Nguyễn Văn Dầu, 1984). Một số chất thơm cũng được tạo thành trong quá trình này và có thể góp phần tạo hương vị đặc trưng cho đậu phụ (Qiao & cs., 2010). Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra sự hiện diện ưu thế của chi *Lactobacillus* trong nước chua đậu phụ, với các chủng đã được phân lập và định danh như *Lactobacillus axitophilus* (Qiao & cs., 2010), *Lactobacillus plantarum* (Li & cs., 2017) và *Lactobacillus casei* (Xu & cs., 2019).

Xuất phát từ những cơ sở trên, đề tài được thực hiện nhằm xác định sự hiện diện của axit lactic - sản phẩm đặc trưng của vi khuẩn lactic - trong nước chua thu từ làng nghề sản xuất đậu phụ truyền thống, đồng thời tiến hành phân lập và định danh các chủng vi khuẩn lactic có mặt trong mẫu nước chua này. Qua đó, nghiên cứu tìm kiếm các chủng vi khuẩn tiềm năng có thể sử dụng làm giống khởi động trong quá trình tạo nước chua, phục vụ sản xuất đậu phụ truyền thống ở quy mô lớn.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu

Nước chua được thu thập tại làng Mơ, phường Mai Động, Hà Nội - một làng nghề truyền thống nổi tiếng với sản xuất đậu phụ.

2.2. Môi trường nuôi cấy vi sinh vật

Môi trường MRS được sử dụng để nuôi cấy các chủng vi khuẩn lactic. Thành phần 1 lít môi trường gồm: 8g cao thịt, 5g cao nấm men, 10g pepton, 20g glucose, 20g agar, 2g $(\text{NH}_4)_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 0,2g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05g $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 3g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 1ml tween 80, 2g K_2HPO_4 , 1.000ml nước cất, pH được điều chỉnh về 6,2-6,5. Môi trường được khử trùng ở 121°C trong 15 phút (Mai Thị Hằng & cs., 2011).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Lấy mẫu nước chua (whey đậu phụ lên men)

Mẫu nước chua được lấy từ ba cơ sở sản xuất đậu phụ sau khi lên men tự nhiên từ 15-18 giờ, mỗi mẫu có thể tích 1 lít. Các cơ sở được ký hiệu là A, B và C. Mẫu được bảo quản ở 2-4°C trước khi phân tích vi sinh.

2.3.2. Phân lập vi khuẩn lactic từ các mẫu nước chua

Vi khuẩn lactic được phân lập theo phương pháp của Nguyễn Lâm Dũng & cs. (1978), sử dụng môi trường MRS agar bổ sung 0,5% CaCO_3 . Sau 48 giờ nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C, quan sát và chọn những khuẩn lạc có đặc điểm hình thái đặc trưng của vi khuẩn lactic để cấy nhiều lần trên môi trường MRS agar đến khi thu được các khuẩn lạc đồng nhất.

2.3.3. Xác định các đặc điểm hình thái, sinh lý, và sinh hóa

Một số phương pháp phân tích vi sinh vật cơ bản được thực hiện theo mô tả bởi Nguyễn Lâm Dũng & cs. (1978), bao gồm:

Quan sát đặc điểm hình thái tế bào

Một lượng nhỏ tế bào vi khuẩn được dàn trên lam kính có sẵn một giọt nước cất vô trùng bằng que cấy vô trùng và được đẩy lamén. Hình dạng và cách sắp xếp của tế bào vi khuẩn được quan sát dưới kính hiển vi quang học với vật kính 100×.

Nhuộm Gram

Vi khuẩn được tiến hành nhuộm Gram theo phương pháp cổ điển của Gram.

Khả năng di động

Các ống nghiệm chứa môi trường MRS bổ sung 0,3-0,5% (w/v) agar được chuẩn bị. Mỗi chủng vi khuẩn được cấy theo đường thẳng xuyên tâm vào trung tâm môi trường thạch bán lỏng bằng kim cấy vô trùng. Đặt ống nghiệm thẳng đứng trong tủ nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 24-48 giờ. Vi khuẩn mọc lan rộng quanh vết cấy hoặc làm đục môi trường xung quanh tức là chúng có khả năng di động. Vi khuẩn chỉ tập trung mọc theo vết cấy chứng tỏ chúng không có khả năng di động.

Xác định khả năng sinh khí từ lên men đường glucose của vi khuẩn lactic

Chủng lactic nuôi trong các ống nghiệm chứa 5ml môi trường MRS dịch thể, bên trong đặt sẵn ống Durham, sau 24h nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C, chủng lên men đường, sinh khí sẽ đẩy ống Durham tạo thành một khoảng trống.

Xác định khả năng phát triển ở 45°C của các chủng vi khuẩn lactic

Các chủng vi khuẩn lactic được nuôi cấy trong môi trường MRS agar mới và ủ ở 45°C trong 24 giờ. Kiểm khả năng phát triển của chủng bằng cách quan sát sự xuất hiện rõ ràng của khuẩn lạc trên đĩa.

2.3.4. Định danh vi khuẩn bằng sinh học phân tử

Các chủng vi khuẩn lactic được định danh bằng phân tích trình tự gen 16S rRNA, tiến hành theo phương pháp được mô tả bởi Pereira & cs. (2008). Chủng vi khuẩn lactic được nuôi trong 10 ml môi trường MRS broth ở nhiệt độ 37°C trong 24h, ly tâm thu sinh khối. DNA của chủng được tách chiết và thực hiện phản ứng khuếch đại PCR sử dụng cặp mồi 27F/1492R với trình tự như sau: 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R: 5'-GGTACCTTGTACGACTT-3'. Thể tích PCR 25µl gồm:

1,5µl dNTP (5mM), 2,5 µl đệm Taq 10X, 1µl mồi mỗi (5µM), 1µl DNA khuôn, 0,3µl Taq DNA polymerase, và 17,5µl nước cất.

Chu trình PCR thực hiện trên máy Mastercycler (Eppendorf AG 22331, Đức) gồm: (1) 95°C trong 5 phút; (2) 95°C trong 45 giây; (3) 55°C trong 1 phút; (4) 72°C trong 45 giây - lặp lại bước (2) đến (4) trong 35 chu kỳ; (5) 72°C trong 5 phút kết thúc phản ứng.

Sản phẩm PCR được giải trình tự bởi công ty First Base (Malaysia). Trình tự gen thu được được đối chiếu với cơ sở dữ liệu GenBank để định danh loài. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng bằng phần mềm MEGA X với phương pháp phân tích Neighbor-Joining, giá trị bootstrap (%) dựa trên 1.000 lần lặp.

2.3.5. Phương pháp phân tích

Xác định các axit hữu cơ thành phần có trong nước chua: Các axit hữu cơ trong nước

chua được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) sử dụng hệ thống HPLC Agilent 1200, cột Bio-Rad Aminex HPX-87H (H⁺ form, 300 × 7,8mm). Pha động là H₂SO₄ 10mM, tốc độ dòng 0,50 ml/phút, nhiệt độ cột 60°C, detector RID. Mẫu được ly tâm và lọc qua màng 0,22μm trước khi tiêm. Định lượng dựa vào chuẩn ngoại (axit lactic, axetic, butyric...) và dựng đường chuẩn cho từng chất phân tích (Andersson & Hedlund, 1983; Rodríguez-Bernaldo de Quirós & cs., 2009).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thành phần axit hữu cơ trong nước chua đậu phụ

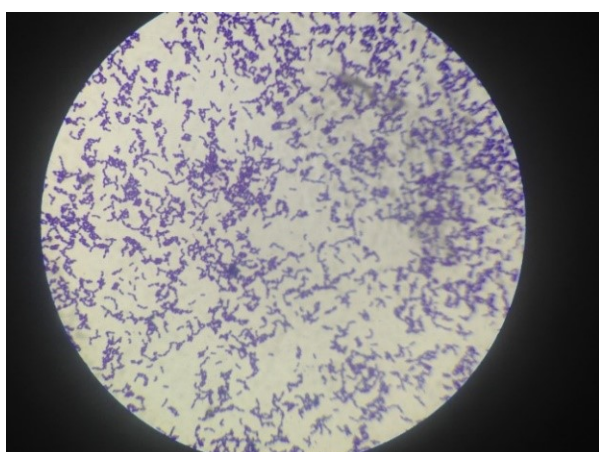
Để kiểm chứng xem vi khuẩn lactic có phải là loài vi khuẩn chiếm ưu thế trong quá trình lên men whey đậu phụ hay không, các mẫu nước

chua từ ba cơ sở sản xuất được xác định thành phần axit hữu cơ bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Kết quả phân tích được trình bày trong bảng 1.

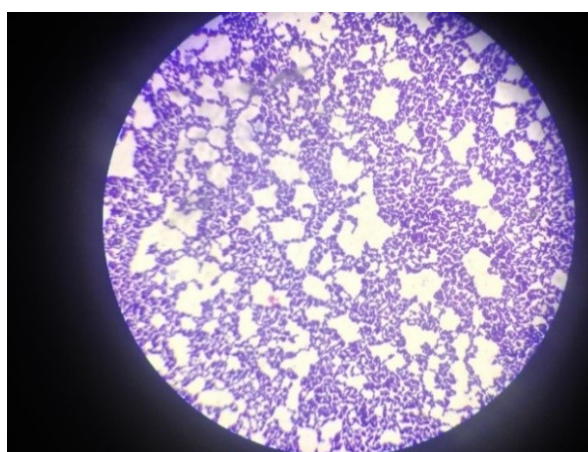
Kết quả phân tích cho thấy, trong nước chua có ba axit chính: axit lactic, axit axetic và axit butyric. Trong đó, axit lactic chiếm chủ yếu với tỷ lệ trung bình là 86%, trong khi axit axetic và axit butyric chiếm tỷ lệ nhỏ hơn nhiều, với giá trị trung bình tương ứng là 9,7% và 4,3%. Kết quả này khá tương đồng với nghiên cứu của Li & cs. (2017), trong đó nước chua từ sản xuất đậu phụ truyền thống tại Trung Quốc có hàm lượng axit lactic dao động từ 2,41-10,49 mg/ml sau thời gian lên men từ 16-24 giờ, chiếm khoảng 77% tổng axit hữu cơ. Với tỷ trọng lớn của axit lactic trong thành phần axit của nước chua, vi khuẩn lactic trong nước chua này sẽ được phân lập và định danh.

Bảng 1. Thành phần axit hữu cơ trong nước chua đậu phụ

Cơ sở sản xuất	Axit lactic (mg/ml)	Axit axetic (mg/ml)	Axit butyric (mg/ml)	Tổng axit (mg/ml)
Cơ sở A	4,29	0,20	0,08	4,57
Cơ sở B	5,28	0,74	0,00	6,02
Cơ sở C	5,19	0,73	0,65	6,56
Trung bình	4,92 ± 0,55	0,56 ± 0,31	0,24 ± 0,35	5,72 ± 1,03
Tỷ lệ (%)	86,0%	9,7%	4,3%	100,0%



(a) Chủng A3 - tế bào hình que, sắp xếp kiểu đơn đôi



(b) Chủng C3 - tế bào hình que, sắp xếp kiểu chuỗi

Hình 1. Hình thái tế bào của một số chủng vi khuẩn lactic

**Bảng 2. Một số đặc điểm hình thái
và khả năng di động của các chủng vi khuẩn lactic phân lập từ nước chua**

Tên chủng	Gram	Hình thái tế bào	Cách sắp xếp tế bào	Khả năng di động
A.1	+	Que ngắn	Đơn, đôi	-
A.2	+	Que ngắn	Đơn, đôi	-
A.3	+	Que dài	Đơn, đôi	-
A.4	+	Hình trứng	Đôi	-
A.5	+	Hình trứng	Chuỗi	-
A.6	+	Que ngắn	Đơn, đôi	-
A.7	+	Que ngắn	Đơn, đôi	-
A.8	+	Hình cầu	Đơn	-
A.9	+	Que ngắn	Đơn, đôi	-
A.10	+	Hình trứng	Chuỗi	-
A.11	+	Hình trứng	Đôi	-
B.1	+	Que ngắn	Đơn, đôi	-
B.2	+	Que ngắn	Đơn, đôi	-
B.3	+	Que dài	Đơn, đôi	-
B.4	+	Que ngắn	Đơn, đôi	-
B.5	+	Que ngắn	Đơn, đôi	-
B.6	+	Que dài	Đơn, đôi	-
B.7	+	Que ngắn	Đơn, đôi	-
B.8	+	Que ngắn	Đơn, đôi	-
B.9	+	Que ngắn	Đôi	-
B.10	+	Que ngắn	Đôi	-
C.1	+	Que dài	Đơn, đôi	-
C.2	+	Que dài	Đơn, đôi	-
C.3	+	Que ngắn	Chuỗi	-
C.4	+	Que ngắn	Đôi	-
C.5	+	Hình trứng	Đôi	-
C.6	+	Que ngắn	Đôi	-
C.7	+	Hình trứng	Đôi	-

Ghi chú: A, B, và C: Ký hiệu chủng phân lập được từ mẫu ở cơ sở A, cơ sở B và cơ sở C; Khả năng di động: (-) không có khả năng.

3.2. Đặc điểm hình thái và khả năng di động của các chủng vi khuẩn phân lập từ các mẫu nước chua lên men tự nhiên

Các mẫu nước chua được pha loãng và cấy lên môi trường MRS agar. Sau 24 giờ nuôi cấy ở điều kiện thích hợp, khuẩn lạc điển hình của vi khuẩn lactic xuất hiện rõ rệt. Khuẩn lạc phát triển nhanh, đồng đều và hầu như không có sự phát triển của vi khuẩn tạp. Quá trình phân lập

sơ bộ thu được tổng cộng 113 chủng vi khuẩn, trong đó 28 chủng thể hiện khả năng phân giải CaCO_3 trong môi trường nuôi cấy. Những chủng này được lựa chọn để tiếp tục phân tích các đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa. Hình thái tế bào của vi khuẩn lactic phân lập được thể hiện trong hình 1.

Nhìn chung, 28 chủng vi khuẩn được phân lập đều tạo khuẩn lạc tròn, bề mặt lồi, trơn bóng, mép nguyên, màu trắng đục, kích thước

dao động từ 0,6-1,5mm. Quan sát dưới kính hiển vi cho thấy đa số các chủng có hình que, tế bào tồn tại dạng đơn, đôi hoặc xếp thành chuỗi ngắn, một số chủng có tế bào hình cầu hoặc hình trứng. Tất cả đều là vi khuẩn G+ và không di động. Các đặc điểm hình thái cấu trúc tế bào của và khả năng di động các chủng vi khuẩn được tổng hợp trong bảng 2.

Khả năng sinh khí từ quá trình lên men đường glucose là một tiêu chí quan trọng để

phân loại vi khuẩn lactic thành hai nhóm: lên men lactic đồng hình (homofermentative) và lên men dị hình (heterofermentative). Bên cạnh đó, khả năng phát triển ở 45°C cũng là một đặc điểm sinh lý có giá trị trong việc phân loại các loài vi khuẩn lactic thành hai nhóm: ưa ấm (mesophilic) và ưa nhiệt (thermophilic) (Axelsson, 2004). Kết quả đánh giá hai đặc tính này ở các chủng phân lập được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3. Kết quả xác định khả năng sinh khí từ lên men đường glucose và khả năng phát triển ở 45°C của các chủng vi khuẩn lactic phân lập được từ nước chua

Tên chủng	Khả năng phát triển ở 45°C	Sinh khí từ glucose
A.1	-	+
A.2	-	+
A.3	+	-
A.4	-	+
A.5	-	-
A.6	+	+
A.7	-	-
A.8	-	-
A.9	-	-
A.10	-	-
A.11	-	-
B.1	+	+
B.2	+	+
B.3	+	+
B.4	+	+
B.5	+	+
B.6	+	+
B.7	+	+
B.8	+	-
B.9	+	+
B.10	+	+
C.1	-	-
C.2	-	+
C.3	-	+
C.4	-	-
C.5	-	+
C.6	-	+
C.7	-	-

Chú thích: Khả năng phát triển ở 45°C: (-) không có khả năng, (+) có khả năng; Khả năng sinh khí từ glucose: (-) không có khả năng, (+) có khả năng sinh khí.

Trong số 28 chủng vi khuẩn được phân lập, có 17 chủng (17/28) có khả năng sinh khí từ đường glucose - một đặc điểm đặc trưng của lên men dị hình. Do đó, chúng có thể được phân loại vào nhóm vi khuẩn lên men lactic dị hình. Đặc biệt, các chủng A6, B2, và C5 có khả năng tạo khí mạnh, với lượng khí sinh ra đủ để đẩy ống Durham nổi lên trên dịch nuôi cấy. Ngoài ra, có 12 chủng (12/28) có khả năng phát triển ở 45°C, chiếm khoảng 42,9% tổng số chủng được phân tích.

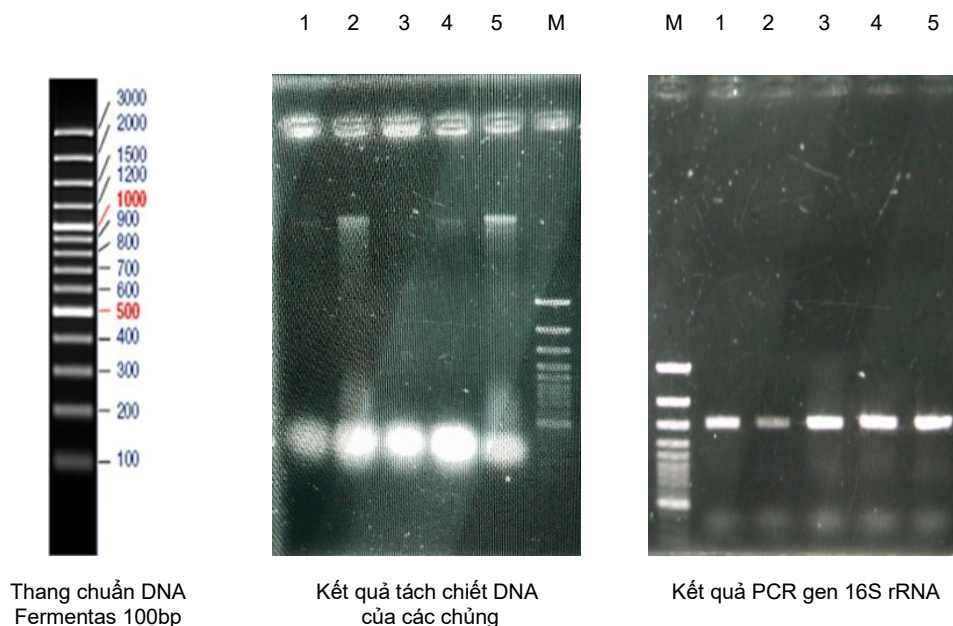
3.3. Kết quả định danh một số chủng vi khuẩn lactic

Sau khi được đánh giá sơ bộ, các chủng vi khuẩn lactic được phân thành 6 nhóm. Trong đó, các chủng hình que chiếm số lượng nhiều hơn và được chia thành 4 nhóm, còn các chủng hình cầu hoặc hình trứng được chia thành 2 nhóm. Cụ thể: nhóm 1 (hình que, có khả năng sinh khí từ glucose và có khả năng phát triển ở 45°C) gồm: A6, B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B9, B10; nhóm 2 (hình que, không có khả năng sinh khí từ glucose, và không có khả năng phát triển ở 45°C) gồm: A7, A9, C1, C4; nhóm 3 (hình que, không có khả năng sinh khí từ glucose, có khả năng phát triển ở 45°C): A3, B8; nhóm 4 (hình que, có khả năng sinh khí từ glucose, không có

khả năng phát triển ở 45°C): A1, A2, C2, C3, C6; nhóm 5 (hình cầu hoặc trứng, có khả năng phát triển ở 45°C): A4, C5, C7; nhóm 6 (hình cầu hoặc trứng, không có khả năng phát triển ở 45°C), gồm A5, A8, A10, và A11.

Do điều kiện phân tích có hạn, chúng tôi đã chọn đại diện 1 chủng từ mỗi nhóm để mang đi giải trình tự gen 16S rRNA. Kết quả điện di sản phẩm PCR đã thu được một băng khoảng 1500bp, tương ứng với kích thước của đoạn gen chuẩn. Điều này cho thấy quá trình khuếch đại gen 16S rRNA của các chủng vi khuẩn lactic đã thực hiện thành công. Hình ảnh kết quả điện di được trình bày ở hình 2.

Sau khi kiểm tra, các sản phẩm PCR có kích thước đúng như kích thước của đoạn gen chuẩn (~ 1.500bp) sẽ được tinh sạch và tiến hành giải trình tự bằng phương pháp Sanger trên hệ thống 3730xl ADN Analyzer (Thermo Scientific, Mỹ). Trình tự gen 16S rRNA của các chủng vi khuẩn lactic sau đó được so sánh với cơ sở dữ liệu GenBank (NCBI) nhằm xác định tên loài dựa trên mức độ tương đồng. Kết quả phân tích cho thấy các chủng vi khuẩn với độ tương đồng 100% với các trình tự đã công bố, được trình bày trong bảng 4 và hình 3.



Ghi chú: 1: Chủng C1; 2: Chủng C2; 3: Chủng A4; 4: Chủng B3; 5: Chủng A3.

Hình 2. Kết quả tách chiết DNA và sản phẩm PCR khuếch đại gen 16S rRNA của các chủng vi khuẩn

Bảng 4. Kết quả định danh 5 chủng vi khuẩn lactic

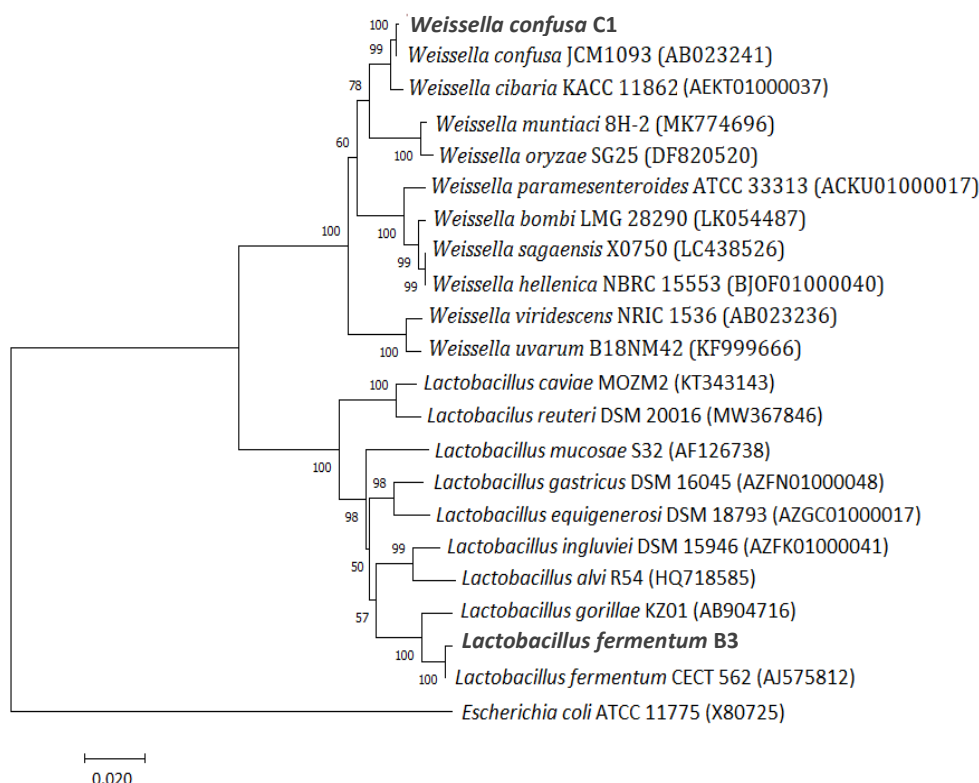
Chủng	Tên loài	Độ tương đồng
B3	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	100%
C1	<i>Weissella confusa</i>	100%
A3	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	100%
C2	<i>Weissella confusa</i>	100%
A4	<i>Weissella confusa</i>	100%

Các chủng vi khuẩn đã định danh đều thuộc nhóm vi khuẩn lactic, với 02 chủng thuộc loài *Lactobacillus fermentum* (*Lb. fermentum*) và 3 chủng thuộc loài *Weissella confusa* (*W. confusa*). Cụ thể, *Lactobacillus fermentum* hiện được gọi là *Limosilactobacillus fermentum* (*L. fermentum*) (Berges & cs., 2020), là loài vi khuẩn lactic thuộc chi *Lactobacillus*, nằm trong nhóm vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* và là loài vi khuẩn lactic nổi bật trong nhóm này. *L. fermentum* là vi khuẩn Gram dương, sống kỵ khí tùy tiện, có khả năng tạo axit lactic, lên men dị hình, có khả năng lên men glucose và ưa nhiệt. Một số chủng có thể sinh trưởng ở 45°C nhưng không sinh trưởng ở 15°C (Holzapfel & Wood, 2014).

Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng *L. fermentum* có mặt trong nhiều thực phẩm khác nhau. Chủng này được tìm thấy trong quần thể LAB của một số loại phô mai (Calasso & Gobbetti, 2011). Theo Naghmouchi & cs. (2019), *L. fermentum* là vi sinh vật quan trọng trong công nghệ làm bánh mì chua, góp phần tạo hương vị, kết cấu hoặc các thành phần của bột bánh mì có lợi cho sức khỏe. *L. fermentum* cũng đã được phân lập từ các sản phẩm sữa chua truyền thống tại Iran (Khorasgani & Shafiei, 2017) và từ *tempoyak* (sầu riêng muối) ở Malaysia (Leisner & cs., 2001). Bằng phương pháp MALDI-TOF MS/TOF™, *L. fermentum* đã được xác định với độ chính xác cao trong các sản phẩm rau củ muối chua truyền thống của Việt Nam như dưa muối, bắp cải muối, cà muối, măng chua (Phan Thi Hang & cs., 2024; Doan Thi Lam Nguyen & cs., 2013), cũng như trong rượu nếp (Phan Thi Hang & cs., 2015).

Weissella confusa là một trong 14 loài vi khuẩn lactic thuộc chi *Weissella*. Đây là vi khuẩn Gram dương, không di động, không sinh bào tử, lên men dị hình, và có loại peptidoglycan trong thành tế bào dạng Lys-Ala. Các tế bào có hình que ngắn hoặc hình oval, kích thước từ 0,8-1,0 × 1,5-3,0µm, có khả năng lên men các loại đường cellobiose, galactose, ribose và xylose. *W. confusa* sản sinh axit lactic dạng D và L, một số chủng có khả năng sinh trưởng ở 45°C (Holzapfel & Wood, 2014).

W. confusa được phân lập từ các nguồn như mía, nước ép cà rốt, thực phẩm lên men và đôi khi từ sữa tươi, nước bột, nước thải và các mẫu lâm sàng. Loài này cũng là một phần của hệ vi sinh vật bình thường trong ruột người (Schleifer, 2009). *W. confusa* đã được tìm thấy là LAB chính trong các sản phẩm rau quả muối chua như kim chi Hàn Quốc (Lee & cs., 2005), sung muối và bắp cải muối của Việt Nam (Phan Thi Hang & cs., 2024), cũng như trong các sản phẩm thịt lên men như xúc xích thịt lợn băm lên men ở Thái Lan (Wongsuphachat & Maneerat, 2010) và nem bùi Việt Nam (Phan Thi Hang & cs., 2024). *W. confusa* cũng có mặt trong bánh truyền thống từ bột gạo lên men của miền Nam Ấn Độ (Lakra & cs., 2020). *W. confusa* là một trong những loài vi khuẩn lactic xuất hiện và chi phối sự biến đổi của hệ vi sinh vật ở bánh men - một thành phần không thể thiếu trong sản xuất rượu truyền thống ở Việt Nam (Vu Nguyen Thanh & cs., 2008). Theo một số tác giả, cả *W. confusa* và *L. Fermentum* đều là vi khuẩn LAB có lợi cho sức khỏe và có tiềm năng probiotic (Swain & cs., 2014; Nguyen La Anh, 2015; Naghmouchi & cs., 2019; Lakra & cs., 2020; Nath & cs., 2021; Dimofte & cs., 2022; Thant & cs., 2024).



Hình 3. Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen 16S rRNA của chủng B3 và C1 với các loài có quan hệ

So với các chủng vi khuẩn đã được phân lập và định danh từ nước chua lên men tự nhiên tại Trung Quốc như *Lactobacillus axitophilus* (Qiao & cs., 2010), *Lactobacillus plantarum* (Li & cs., 2017) và *Lactobacillus casei* (Xu & cs., 2019), hai chủng *L. fermentum* và *W. confusa* tìm thấy trong nước chua làng Mơ cho thấy sự khác biệt về hệ vi sinh vật. Điều này cho thấy rằng điều kiện lên men tự nhiên và quy trình sản xuất ở từng địa phương có thể ảnh hưởng đáng kể đến sự phát triển của vi khuẩn lactic trong nước chua.

4. KẾT LUẬN

Hai mươi tám chủng vi khuẩn được phân lập từ nước chua đậu phụ truyền thống thể hiện các đặc điểm điển hình của vi khuẩn lactic. Kết quả định danh cho thấy trong số 28 chủng, có 2 chủng thuộc loài *Limosilactobacillus fermentum* và 3 chủng thuộc loài *Weissella confusa*. Điều này gợi ý rằng đây có thể là những loài vi khuẩn lactic chiếm ưu thế trong nước chua đậu phụ. Kết quả thu được là cơ sở ban đầu cho việc

tuyển chọn các chủng vi khuẩn tiềm năng để làm chủng khởi động (starter culture) trong quá trình lên men whey, nhằm tạo ra tác nhân đông tụ đậu phụ có chất lượng cao. Các chủng vi khuẩn này cần tiếp tục được đánh giá về khả năng lên men và sinh tổng hợp các chất chuyển hóa có lợi cho sức khỏe.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Andersson R. & Hedlund B. (1983). HPLC analysis of organic acids in lactic acid fermented vegetables. *Z Lebensm Unters Forsch.* 176(6): 440-443.
- Axelsson L. (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Salminen S., Wright A.V. & Ouwehand A., Eds. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. 3rd Edition, Marcel Dekker, New York. pp. 1-67.
- Berges M., Furlan M. & Orozco J. (2020). *Limosilactobacillus*, a new genus for *Lactobacillus* and related species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 70(4): 1852-1864.
- Cai T.D. & Chang K.C. (1998). Characteristics of production-scale tofu as affected by soymilk

- coagulation method: propeller blade size, mixing time and coagulation concentration. *Food Research International*. 31(4): 289-295.
- Calasso M. & Gobetti M. (2011). Lactic Axit Bacteria - *Lactobacillus* spp.: Other Species, *Encyclopedia of Dairy Sciences*. pp. 25-131.
- Cao H., Li X.J., Luo S.Z., Mu D.D., Zhong X.Y., Jiang S.T. & Zhao Y.Y. (2017). Effects of organic axit coagulants on the physical properties of and chemical interactions in tofu. *LWT-Food Science and Technology*. 85: 58-65.
- Chang K.C. (2007). Soymilk and tofu manufacturing. *In: Hui Y.H. (Ed.). Handbook of food products manufacturing*. John Wiley & Sons Inc. pp. 1063-1089.
- Dimofte A., Simionescu N., Petrovici A-R., & Spiridon I. (2022). Probiotic Properties of *Weissella confusa* PP29 on *Hibiscus sabdariffa* L. Media. *Fermentation*. 8(10): 553.
- Doan Thi Lam Nguyen, Van Hoorde K., Cnockaert M., De Brandt E., Aerts M., Le Binh Thanh, & Vandamme P. (2013). A description of the lactic axit bacteria microbiota associated with the production of traditional fermented vegetables in Vietnam. *International Journal of Food Microbiology*. 163(1): 19-27.
- Guan X., Zhong X., Lu Y., Du X., Jia R., Li H., & Zhang M. (2021). Changes of Soybean Protein during Tofu Processing. *Foods*. 10: 1594-1609.
- Hà Đức Hồ (2005). Kỹ thuật chế biến đậu tương. Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- Holzappel W.H. & Wood B.J.B. (2014). Lactic Axit Bacteria- Biodiversity and Taxonomy, chapter 2: 4-5. Wiley.
- Khorasgani M.R. & Shafiei R. (2017). Chapter 16 - Traditional Yogurt as a Source of Lactobacilli and Other Lactic Axit Bacteria in Iran. *In: Shah N.P (Ed.). Yogurt in Health and Disease Prevention*. Elsevier. pp. 285-294.
- Kudelka W., Kowalska M., & Popis M. (2021). Quality of Soybean Products in Terms of Essential Amino Acids Composition. *Molecules*. 26(16): 5071-5079.
- Lakra A.K., Domdi L., Hanjon G., Tilwani Y.M. & Arul V. (2020). Some probiotic potential of *Weissella confusa* MD1 and *Weissella cibaria* MD2 isolated from fermented batter. *LWT*. 125: 109261.
- Lê Ngọc Tú (2001). Hoá học thực phẩm. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- Lee J-S., Heo G-Y., Lee J. W., Oh Y-J., Park J.A., Park Y-H., Pyun Y-R., & Ahn J.S. (2005). Analysis of kimchi microflora using denaturing gradient gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol*. 102(2): 143-50.
- Leisner J.J., Vancanneyt M. & Rusul G. (2001). Identification of lactic axit bacteria constituting the predominating microflora in an axit-fermented condiment (tempoyak) popular in Malaysia. *International Journal of Food Microbiology*. 63(1-2): 149-157.
- Li C., Rui X., Zhang Y., Cai F., Chen X. & Jiang, M. (2017). Production of tofu by lactic axit bacteria isolated from naturally fermented soy whey and evaluation of its quality. *LWT - Food Science and Technology*. 82: 227-234.
- Mai Thị Hằng, Đinh Thị Kim Nhung & Vương Trọng Hào (2011). Thực hành vi sinh vật học. Nhà xuất bản Đại học Sư phạm.
- Messina, M.J. (1997). Soyfoods: Their Role in Disease Prevention and Treatment. *In: Liu K.S (Ed.). Soybeans: Chemistry, Technology, and Utilization* edited by. Springer, Boston, MA.
- Naghmouchi K., Belguesmia Y., Bendali F., Spano G., Seal B.S. & Drider D. (2019). *Lactobacillus fermentum*: a bacterial species with potential for food preservation and biomedical applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 60(20): 3387-3399.
- Nath S., Roy M., Sikidar J., Deb B., Sharma I., & Guha A. (2021). Characterization and in-vitro screening of probiotic potential of novel *Weissella confusa* strain GCC_19R1 isolated from fermented sour rice. *Current Research in Biotechnology*. 3: 99-108.
- Nguyen La Anh (2015). Health-promoting microbes in traditional Vietnamese fermented foods: A review. *Food Science and Human Wellness*. 4(4): 147-161.
- Nguyễn Lâm Dũng, Đoàn Xuân Mượu, Nguyễn Phùng Tiến, Đặng Đức Trạch & Phạm Văn Ty (1978). Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học (Tập 3). Nhà xuất bản Khoa học - Kỹ thuật Hà Nội.
- Nguyễn Văn Dầu (1984). Chế biến đậu nành và lạc thành thức ăn giàu protein. Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- Pereira F., Carneiro J. & Amorim A. (2008). Identification of species with DNA - based technology: current progress and challenges. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences*. 2: 187-200.
- Phan Thi Hang G., Husáková M., Kaštánek P. & Patakova P. (2024). Diversity of cultivable lactic axit bacteria and bacilli in traditional fermented foods in Vietnam. *Czech Journal of Food Sciences*. 42(6): 1-12.
- Qiao Z., Chen X.D., Cheng Y.Q., Liu H., Liu Y.Q. & Li L. (2010). Microbiological and Chemical Changes During the Production of Axitic Whey, A Traditional Chinese Tofu- Coagulant. *International Journal of Food Properties*. 13(1): 90-104.

- Rodríguez-Bernaldo de Quirós A., Lage-Yusty M.A. & López-Hernández J. (2009). HPLC analysis of organic acids using a novel stationary phase. *Talanta*. 78(2): 643-646.
- Rui X., Fu Y., Zhang Q., Li W., Zare F., Chen X., Jiang M. & Dong M. (2016). A comparison study of bioaccessibility of soy protein gel induced by magnesium chloride, glucono- δ -lactone and microbial transglutaminase. *LWT - Food Science and Technology*. 71: 234-242.
- Schleifer K-H. (2009). Phylum XIII. Firmicutes Gibbons and Murray 1978, 5 (Firmicutes [sic] Gibbons and Murray 1978, 5). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*: Springer. pp. 19-1317.
- Swain M.R., Anandharaj M., Ray R.C. & Rani R.P. (2014). Fermented Fruits and Vegetables of Asia: A Potential Source of Probiotics *Biotechnol. Res. Int.* 28: 250424.
- Thant E.P., Surachat K., Chusri S., Romyasamit C., Pomwiset R., Wonglapsuwan M., Yaikhan T., Suwannasin S. & Singkhamanan K. (2024). Exploring R., Wonglapsuwan M., Yaikhan T., Suwannasin S. & Singkhamanan K. (2024). Exploring *Weissella confusa* W1 and W2 Strains Isolated from Khao-Mahk as Probiotic Candidates: From Phenotypic Traits to Genomic Insights. *Antibiotics (Basel)*. 13(7): 604.
- Vu Nguyen Thanh, Le Thuy Mai & Duong Anh Tuan (2008). Microbial diversity of traditional Vietnamese alcohol fermentation starters (banh men) as determined by PCR-mediated DGGE. *International Journal of Food Microbiology*. 128(2): 268-273.
- Wang H. & Damodaran S. (1991). Thermal Gelation of Globular Proteins: Influence of Protein Conformation on Gel Strength. *J. Agric. Food Chem.* 39: 433-438.
- Wongsupphachat W. & Maneerat S. (2010). Optimization of exopolysaccharides production by *Weissella confusa* NH 02 isolated from Thai fermented sausages. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 32(1): 27-35.
- Xu Y., Ye Q., Zhang H., Yu Y., Li X., Zhang Z. & Zhang L. (2019). Naturally Fermented Axit Slurry of Soy Whey: High-Throughput Sequencing-Based Characterization of Microbial Flora and Mechanism of Tofu Coagulation. *Frontiers in Microbiology*. 10: 1-3. doi: 10.3389/fmicb.2019.01088.
- Zhang Q., Lia W., Fenga M. & Donga M. (2013). Effects of different coagulants on coagulation behavior of acid-induced soymilk. *Food Hydrocolloids*. 33: 106-110.
- Zhu Q., Wu F., Saito M., Tatsumi E. & Yin L. (2016). Effect of magnesium salt concentration in water-in-oil emulsions on the physical properties and microstructure of tofu. *Food Chemistry*. 201: 197-204.