

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ NUÔI CẤY CHỦNG VI KHUẨN LACTIC ĐỐI KHÁNG VỚI CHỦNG NẤM MỐC GÂY THỐI HỒNG QUẢ DẦU TÂY

Ngô Thị Tường Châu^{1*}, Phan Thị Thảo Ly², Nguyễn Thị Tú Lệ¹, Lê Văn Thiện¹

TÓM TẮT

Kết hợp lợi khuẩn vào lớp phủ ăn được nhằm bảo quản quả tươi là một phương pháp mới nhất của ngành công nghiệp thực phẩm. Mục tiêu của nghiên cứu này là tuyển chọn và xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp cho quá trình tạo sinh khối của vi khuẩn lactic (LAB) có khả năng đối kháng với nấm mốc gây thối hồng quả dầu tây. Nấm mốc được phân lập trên PDA bổ sung 1% Chloramphenicol, 25°C, 5 - 7 ngày. LAB được phân lập trên thạch MRS, 37°C, 2 - 3 ngày. LAB đối kháng cao với nấm mốc được tuyển chọn bằng phương pháp đĩa thạch 2 lớp. LAB được nuôi cấy trong MRS dịch thể ở pH 4,0 - 8,0, 20 - 40°C, 1 - 5 ngày. Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến hoạt tính kháng nấm của dịch nổi vô bào (CFS) được khảo sát ở pH 4,5 - 6,5, 60 - 100°C, 2 giờ. Kết quả phân lập được chủng Nd4 gây thối hồng quả dầu tây với mật độ nhiễm cao ($1,2 \times 10^3$ CFU/g) và tuyển chọn được chủng Ld3 có khả năng đối kháng cao (đường kính vòng ức chế đạt 35 mm). Điều kiện nuôi cấy thích hợp cho quá trình tạo sinh khối của chủng Ld3 là pH 6, 30°C, 2 ngày. Hoạt tính kháng nấm giảm đáng kể (còn lại 51%) khi pH của CFS được điều chỉnh đến 6,5, tuy nhiên hoạt tính này không giảm sau xử lý nhiệt.

Từ khoá: Dầu tây, hoạt tính kháng nấm, lợi khuẩn, nấm mốc gây thối hồng quả, vi khuẩn lactic.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dầu tây là một loại quả có các thuộc tính đặc biệt về hình thức, màu sắc và giá trị dinh dưỡng [1]. Dầu tây chứa một nguồn dinh dưỡng phong phú chủ yếu là các protein, khoáng chất, chất xơ, vitamin, anthocyanin, flavonoid và hợp chất phenolic [2, 3]. Tuy nhiên, dầu tây có cấu trúc rất dễ dập nát do tác động cơ học, có cường độ hô hấp cao và tuổi thọ sau thu hoạch tương đối ngắn. Thời hạn sử dụng của sản phẩm tươi được giới hạn từ 1 đến 2 ngày ở nhiệt độ phòng [4]. Nguyên nhân chủ yếu gây thối hồng quả là do sự lây nhiễm nấm [5].

Gần đây, kết hợp lợi khuẩn vào lớp phủ ăn được nhằm cải thiện chất lượng, chức năng và thời hạn sử dụng quả tươi là một phương pháp mới nhất của ngành công nghiệp thực phẩm [6]. Lợi khuẩn trong lớp phủ ăn được không chỉ nâng cao

tính ổn định của quả tươi mà còn là tác nhân kiểm soát sinh học chống lại các mầm bệnh thực vật khác nhau trong quá trình bảo quản sau thu hoạch [7]. Trong đó, vi khuẩn lactic (LAB) là nhóm nổi bật nhất với các lợi ích về sức khỏe con người và thường được phân lập từ sữa, rau và quả tươi [8]. Trên thực tế, việc kết hợp *Lactobacillus plantarum* vào lớp phủ ăn được từ carboxymethyl cellulose đã làm giảm sự phát triển của nấm mốc và nấm men trên bề mặt của quả dầu tây. Đồng thời cải thiện một số đặc tính lý, hoá của quả dầu tây được phủ so với đối chứng bằng cách giảm hao hụt khối lượng, thối hồng và làm chậm tốc độ mất vitamin C và các hợp chất phenolic trong suốt thời gian bảo quản [9].

Để tạo nguồn LAB cho sản xuất lớp phủ ăn được ứng dụng trên quả dầu tây sau thu hoạch, nghiên cứu này đã tiến hành phân lập và tuyển chọn chủng LAB có khả năng đối kháng với chủng nấm mốc gây thối hồng quả dầu tây. Đồng thời, xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp cho quá trình tạo sinh khối và ảnh hưởng của pH và nhiệt

¹ Khoa Môi trường, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

* Email: ngotuongchau@hus.edu.vn

² Khoa Y Dược, Đại học Đà Nẵng

độ đến hoạt tính kháng nấm của dịch nổi vô bào (CFS) từ chủng LAB.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu, hoá chất và thiết bị

- Các quả dâu tây tươi giống Tochiotome (Hana) xuất xứ từ Nhật Bản được thu thập tại các vườn trồng tại huyện Mộc Châu- Sơn La, Sa Pa- Lào Cai và Đà Lạt- Lâm Đồng. Lựa chọn các quả có cùng kích cỡ, hình dạng bình thường, không bị nhiễm vi sinh vật hoặc tổn thương vật lý và chín đều (TCVN 9017: 2011), sau đó xếp vào các hộp nhựa, đặt trong thùng carton và nhanh chóng vận chuyển về phòng thí nghiệm Nghiên cứu Môi trường và Thực phẩm của Khoa Môi trường, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

- Hoá chất: Môi trường PDA (HiMedia- Ấn Độ), Chloramphenicol, môi trường thạch MRS, môi trường MRS dịch thể (Merck, Đức), dung dịch sodium hypochlorite 1%, Tween 85, dung dịch nước muối pepton 0,1%, bộ thuốc nhuộm Gram, dung dịch H_2O_2 3% và dung dịch Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride 1% (Merck, Đức).

- Thiết bị: Tủ an toàn sinh học (Biovanguard 4/ AZBIL TELSTAR- Tây Ban Nha), tủ ẩm ổn nhiệt (Mettler- Đức), máy lắc ổn nhiệt (Innova 44R/ Eppendorf- Đức), máy ly tâm (5810 R, Eppendorf, Hamburg, Đức), bể siêu âm (Nahita, Model 626/6, Alea Equipment) và bể ổn nhiệt (BS-06/Jeiotech- Hàn Quốc).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập nấm mốc gây thối hồng quả dâu tây

Lấy ngẫu nhiên 25 quả dâu tây từ mỗi địa điểm thu mẫu, đặt trong các hộp nhựa, giữ ở nhiệt độ thường (30 - 32°C). Khi triệu chứng bệnh xuất hiện rõ ràng, mỗi nhóm chọn ra 5 quả mới nhiễm bệnh để định lượng nấm mốc có trong 1 g mẫu (TCVN 82751: 2010) và tiến hành phân lập. Trước tiên, các quả bị thối hồng được khử trùng bề mặt bằng dung dịch sodium hypochlorite 1% trong 1 phút và rửa lại bằng nước cất 3 lần. Sau đó, những phần bị thối hồng được đặt trên các đĩa môi trường PDA có

bổ sung 1% Chloramphenicol và ủ ở 25°C, trong 5-7 ngày. Chọn các khuẩn lạc nấm mốc có hình thái đặc trưng và cấy chuyển sang các đĩa môi trường PDA bằng phương pháp cấy điểm để thu các chủng nấm thuần khiết và đơn khuẩn lạc.

2.2.2. Thử nghiệm khả năng gây bệnh của nấm

Thử nghiệm lặp lại 3 lần độc lập trên quả dâu tây khỏe với các chủng nấm được phân lập. Đầu tiên, khử trùng bề mặt quả bằng cách rửa với dung dịch sodium hypochlorite 0,1% trong 1 phút, rửa lại với nước máy và để khô không khí ở nhiệt độ thường. Sau đó, tạo một vết thương (đường kính 3 mm, sâu 3 mm) trên bề mặt quả bằng một kim giải phẫu vô trùng [10]. Để đánh giá khả năng gây bệnh của nấm, nấm được nuôi cấy 7 - 15 ngày trước đó ở 25°C trên môi trường PDA. Bào tử được cạo ra khỏi môi trường thạch bằng cách sử dụng một vòng đầu que cấy vô trùng và chuyển vào nước cất vô trùng chứa 0,01% Tween 85. Huyền phù bào tử được phân tán khoảng 5 phút trong một bể siêu âm và nồng độ cuối cùng được điều chỉnh đến 10^4 bào tử/ml bằng một buồng đếm tế bào. Cấy 10 μ l dịch huyền phù bào tử vào vết thương của các quả dâu tây và các quả được cấy với 10 μ l nước vô trùng vào vết thương được sử dụng làm đối chứng. Các quả sau khi cấy được giữ trong các hộp nhựa đậy kín để duy trì độ ẩm cao và ủ ở 25°C trong 5 ngày. Kiểm tra vết bệnh và phân lập nấm từ các vết bệnh trên quả dâu tây. Xác nhận các đặc điểm hình thái tương tự như các chủng phân lập ban đầu. Các chủng nấm đạt tiêu chuẩn theo định đề Koch được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo [10, 11].

2.2.3. Phân lập LAB từ quả dâu tây

Chọn các quả dâu tây tươi không bị dập nát hoặc nhiễm bệnh và bổ làm bốn bằng dao vô trùng. Cân 10 g mẫu và cho vào một túi dập mẫu, thêm 90 ml dung dịch nước muối pepton vô trùng và đặt túi vào trong máy dập mẫu để đồng nhất mẫu trong khoảng 2 phút. Dịch huyền phù được pha loãng theo dãy thập phân và cấy trên đĩa môi trường MRS bằng phương pháp hộp đổ. Các đĩa được nuôi cấy ở 37°C, trong 2 - 3 ngày. Quan sát hình thái khuẩn lạc và tế bào, nhuộm Gram, kiểm

tra hoạt tính catalase dựa vào khả năng tạo bọt hay không tạo bọt khi nhỏ dung dịch H_2O_2 3% lên khuẩn lạc [12]. Hoạt tính oxidase dựa vào khả năng làm thay đổi màu Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride 1% của các chủng vi khuẩn [13]. Vi khuẩn có dạng trực khuẩn hoặc cầu khuẩn, Gram dương, catalase và oxidase âm tính được giả định là LAB. Các chủng LAB được cấy chuyển sang môi trường MRS bằng phương pháp cấy rìa để thu được các chủng thuần khiết. Lưu giữ các chủng LAB trên môi trường thạch nghiêng MRS ở 4°C.

2.2.4. Tuyển chọn vi khuẩn lactic đối kháng với nấm mốc gây thối hỏng quả dâu tây

Các chủng LAB đối kháng với nấm được tuyển chọn bằng phương pháp đĩa thạch 2 lớp [14]. Trước thử nghiệm, các chủng LAB được nuôi cấy 24 giờ trong môi trường MRS dịch thể (Merck, Đức) ở 37°C và nấm mốc được nuôi cấy trên môi trường PDA ở 25°C trong 72 giờ. Dịch huyền phù bào tử nấm được chuẩn bị bằng cách phân tán bào tử trong 10 ml dung dịch NaCl 0,9% chứa 0,2% Tween 80. Trước tiên, nhỏ 20 ml dịch vi khuẩn ($OD_{600} = 0,5$) vào chính giữa bề mặt của đĩa chứa một lớp môi trường thạch MRS và ủ ở 30°C trong 2-3 ngày. Sau đó, đổ thêm một lớp môi trường PDA chứa khoảng 10^4 bào tử nấm/ml lên trên bề mặt của đĩa và ủ ở 25°C trong 3 - 5 ngày. Kiểm tra sự hình thành các vòng ức chế sự phát triển của nấm xung quanh khuẩn lạc vi khuẩn. Khả năng đối kháng được đánh giá thông qua đường kính của vòng ức chế.

2.2.5. Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến quá trình tạo sinh khối của LAB

Hoạt hóa các chủng LAB bằng cách cấy chuyển vào môi trường MRS dịch thể và nuôi cấy ở 37°C trong 24 giờ. Cấy dịch nuôi cấy LAB vào các bình tam giác chứa 100 ml môi trường MRS dịch thể ở pH 4,0 - 8,0 và nuôi cấy ở nhiệt độ 20 - 40°C trong 1 - 5 ngày. Đo mật độ OD tại bước sóng 600 nm.

2.2.6. Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến hoạt tính kháng nấm của CFS

Thu hồi CFS của LAB bằng cách loại bỏ các tế bào sau khi ly tâm dịch nuôi cấy ở 4°C, tốc độ 5.000 vòng/phút, trong 15 phút và lọc qua màng lọc có kích thước lỗ 0,45 μm . Để kiểm tra ảnh hưởng của pH đến hoạt tính kháng nấm, pH của CFS đã được điều chỉnh thành 4,5 - 6,5 bằng dung dịch NaOH 1 M. Để kiểm tra ảnh hưởng của nhiệt độ pH đến hoạt tính kháng nấm, CFS đã được đặt trong các bể ổn nhiệt tại 60°C, 80°C hoặc 100°C trong 2 giờ. Xác định hoạt tính kháng nấm bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Theo đó, các đĩa thạch PDA chứa 10^4 bào tử nấm/ml đã được chuẩn bị và các giếng (đường kính 5 mm) được tạo ra trên đĩa thạch. Nhỏ 100 μl CFS vào giếng và ủ ở 25°C trong 2 ngày. Kiểm tra sự hình thành các vòng ức chế nấm xung quanh giếng. Hoạt tính kháng nấm của CFS được đánh giá thông qua kích thước đường kính vòng ức chế (mm). Hoạt tính tại pH và nhiệt độ tối ưu được xác định là 100%.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập nấm mốc gây thối hỏng quả dâu tây

Bảng 1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của nấm mốc phân lập từ dâu tây bị thối hỏng

Nhóm mẫu	Ký hiệu chủng	Màu sắc (mặt trước/sau)
Mộc Châu-Son La	Nd1	Khi non sợi khuẩn ty màu trắng, tản nấm đều, tạo bông trên bề mặt, khi già sợi khuẩn ty chuyển thành màu xanh xám, mặt sau tản nấm màu xanh không đều, rìa ngoài màu trắng, tâm đen, mọc rất nhanh ở 30°C.
	Nd2	Mặt trước tản nấm màu trắng, mặt sau rìa ngoài màu trắng, vòng giữa có màu vàng, tâm nấm màu xanh, nấm mọc chậm, bé.

	Nd3	Vòng ngoài tản nấm màu trắng, tản nấm màu xanh, sợi khuẩn ty không mọc bông xốp, mặt sau tản nấm có màu trắng ngà.
	Nd4	Khi non sợi khuẩn ty màu xanh, rìa ngoài màu trắng, không tạo bông xốp trên bề mặt, khi già sợi khuẩn ty hóa xám.
	Nd5	Tản nấm màu nâu xám, rìa ngoài tản nấm màu xanh, sợi khuẩn ty không mọc bông xốp, mặt sau tản nấm màu xanh đen.
Sa Pa- Lào Cai	Nd6	Tản nấm màu trắng, rìa ngoài tản nấm màu xanh, sợi khuẩn ty tạo bông trắng xốp, mặt sau tản nấm màu xanh đen tạo thành vòng.
	Nd7	Khi non tản nấm có màu trắng, sợi khuẩn ty tạo bông trắng xốp trên bề mặt, rìa ngoài tạo vòng hơi xanh, tản nấm có vòng màu hồng trong có những sợi xám, mặt sau tản nấm màu xanh đen, khi già có nhiều sợi màu hồng, mặt sau màu xanh đen, tản màu trắng.
	Nd8	Tản nấm màu xanh, rìa ngoài tản nấm trắng, không tạo bông xốp trên bề mặt, mặt sau tản nấm màu trắng.
	Nd9	Tản nấm mọc đều, màu xanh, rìa ngoài tản nấm sợi màu trắng.
	Nd10	Tản nấm màu xanh, mọc không đều, tạo những cục nổi hẳn lên bề mặt, mặt sau tản nấm màu xanh đen, mọc rất chậm.
Đà Lạt- Lâm Đồng	Nd11	Tản nấm mọc đều, tạo vòng ngoài màu trắng, tản nấm màu cam, mặt sau tản nấm màu cam, tạo từng vòng.
	Nd12	Tản nấm màu xanh, mọc thưa, mọc nhanh.
	Nd13	Tản nấm màu trắng sữa, không tạo bông xốp trên bề mặt.
	Nd14	Tản nấm mọc đều, màu xanh, rìa ngoài vòng trắng, không tạo bông xốp trên bề mặt.

Tất cả các quả dâu tây bị thối hồng (n = 15) của 3 nhóm mẫu thu từ Mộc Châu, Sa Pa và Đà Lạt đã được sử dụng để phân lập nấm. Bước đầu thu được 14 khuẩn lạc khác nhau về hình thái trên các đĩa môi trường PDA có bổ sung 1% Chloramphenicol (Bảng 1). Các chủng phân lập được phân nhóm theo các đặc điểm hình thái như màu sắc của sợi nấm, kết cấu và rìa của khuẩn lạc. Điều này cho thấy, dâu tây bị thối hồng chứa nhiều loại nấm khác nhau. Theo Lorenzini và cs

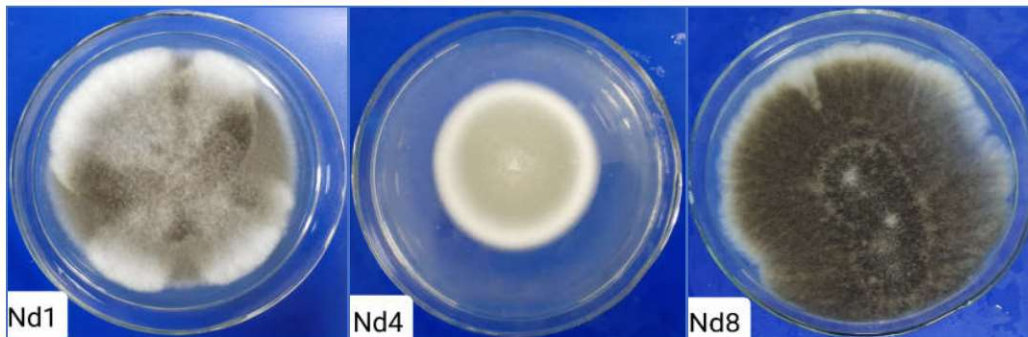
(2018), hệ nấm bao gồm cả loại nấm gây bệnh sau thu hoạch và không gây bệnh [15]. Do đó, cần kiểm tra khả năng gây bệnh của các chủng phân lập được để loại trừ các chủng không gây bệnh.

3.2. Sàng lọc các chủng nấm có khả năng gây bệnh từ các chủng nấm được phân lập

Để xác định xem tất cả các chủng nấm phân lập từ dâu tây thối hồng có khả năng gây bệnh cho quả dâu tây khỏe hay không, thử nghiệm gây bệnh

đã được thực hiện trên 14 chủng phân lập. Từ thử nghiệm gây bệnh ban đầu, chỉ có 03 chủng (Nd1, Nd4, Nd8) tạo ra các triệu chứng bệnh có thể được phát hiện sau gây nhiễm 6 ngày. Khả năng gây bệnh của các chủng này đã được xác nhận thêm theo các định đề của Koch bằng cách phân lập lại các loại nấm gây bệnh và xác nhận các đặc điểm hình thái với chủng ban đầu (Hình 1). Các định đề của Koch là cơ sở thiết lập khả năng gây bệnh của một vi sinh vật trong một quá trình bệnh được

cộng đồng khoa học ủng hộ mạnh mẽ [16]. Kết quả đã phân lập và xác định được chủng nấm mốc Nd4 gây thối hỏng quả dâu tây với mật độ nhiễm cao ($1,2 \times 10^3$ CFU/g). Tiến hành định danh sơ bộ chủng nấm mốc Nd4 bằng phương pháp so sánh hình thái (morpho-taxonomy) được mô tả ở bảng 1 với hệ thống phân loại lưỡng phân được tổng kết trong "Bảng phân loại các loài nấm mốc thường gặp" [17], bước đầu cho thấy chủng Nd4 thuộc chi *Penicillium*.



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc của các chủng nấm mốc gây bệnh được phân lập

3.3. Phân lập và tuyển chọn LAB từ quả dâu tây

Từ các mẫu dâu tây tươi không bị dập nát hoặc nhiễm bệnh ($n = 15$) đã bước đầu phân lập được 7 khuẩn lạc khác nhau về hình thái trên các đĩa môi trường MRS (ký hiệu từ Ld1 đến Ld7). Với kết quả là trực khuẩn Gram dương, catalase và oxidase âm tính, tất cả các chủng vi khuẩn này được giả định là LAB. Tiếp tục đánh giá hoạt tính đối kháng với nấm của các chủng LAB theo phương pháp đĩa thạch 2 lớp. Kết quả cho thấy, chủng Ld3 có khả năng đối kháng với chủng nấm Nd4 là cao nhất (đường kính vòng ức chế đạt đến 35 mm) (Hình

2). Chủng Ld3 có khuẩn lạc màu trắng sữa, dạng tròn và kích thước nhỏ (đường kính 3,5 mm), hoàn toàn tương tự với chủng tham khảo thuộc chi *Lactobacillus* spp. khi phát triển trên môi trường MRS. Tiến hành khuếch đại vùng gen 16S rRNA với cặp mồi 27F/1492R và giải trình tự bằng phương pháp Sanger và BLAST đối chiếu trên NCBI. Kết quả cho thấy, trình tự gen 16S rRNA của chủng Ld3 tương đồng 99,93% so với trình tự vùng gen tương ứng của của chủng *Lactobacillus paracasei* 4613. Vì vậy, chủng Ld3 được định tên là *Lactobacillus paracasei* Ld3.



Hình 2. Hoạt tính đối kháng với chủng Nd4 gây thối hỏng quả của chủng vi khuẩn Ld3

3.4. Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến quá trình tạo sinh khối của chủng Ld3

3.4.1. pH ban đầu của môi trường

Tiến hành nuôi cấy chủng Ld3 trong môi trường MRS dịch thể với pH 4,0-8,0, ở nhiệt độ 30°C, trong 2 ngày (mục 2.2.5), kết quả cho thấy

sinh khối đạt cao nhất ở pH ban đầu của môi trường nuôi cấy là 6,0 (Bảng 2). Tương tự, Zhao và cs (2022) báo cáo chủng *L. plantarum* ZZUA493 đối kháng với nấm có khả năng sinh trưởng và phát triển trong môi trường MRS dịch thể với pH 3-10, tối ưu ở pH 5,5 và 6,0 [18].

Bảng 2. Ảnh hưởng của pH môi trường đến quá trình tạo sinh khối của chủng Ld3

pH	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0
OD ₆₀₀	2,251 ^e ± 0,009	2,319 ^d ± 0,026	2,616 ^a ± 0,042	2,451 ^b ± 0,025	2,373 ^c ± 0,010
Sinh khối (g/l)	0,615 ^e ± 0,003	0,636 ^d ± 0,007	0,725 ^a ± 0,012	0,675 ^b ± 0,007	0,652 ^c ± 0,003

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một hàng chỉ sự sai khác trung bình mẫu có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test). $M \pm SE$: Trung bình mẫu ± sai số chuẩn.

3.4.2. Nhiệt độ nuôi cấy

Tiến hành nuôi cấy chủng Ld3 trong môi trường MRS dịch thể (pH tối ưu), ở nhiệt độ 20-40°C trong 2 ngày (mục 2.2.5), kết quả cho thấy sinh khối đạt cao nhất tại 30°C (Bảng 3). Trong

khi đó, chủng *L. plantarum* ZZUA493 đối kháng với nấm, khi nuôi cấy trong môi trường MRS dịch thể, có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt trong khoảng nhiệt độ 10 - 40°C [18].

Bảng 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến quá trình tạo sinh khối của chủng Ld3

Nhiệt độ (°C)	20	25	30	35	40
OD ₆₀₀	2,527 ^d ± 0,005	2,616 ^c ± 0,012	2,832 ^a ± 0,035	2,720 ^b ± 0,006	2,352 ^e ± 0,021
Sinh khối (g/l)	0,698 ^d ± 0,001	0,725 ^c ± 0,003	0,789 ^a ± 0,009	0,756 ^b ± 0,002	0,646 ^e ± 0,006

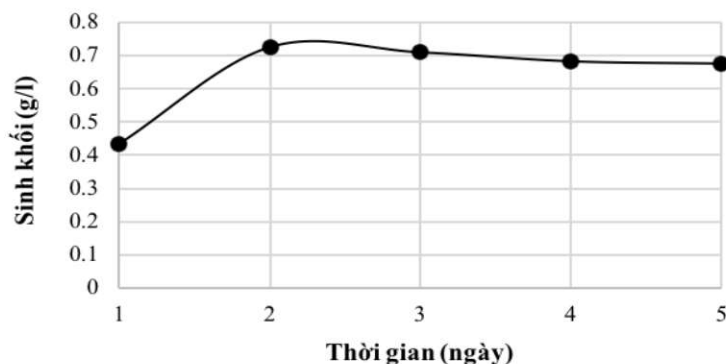
Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một hàng chỉ sự sai khác trung bình mẫu có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test). $M \pm SE$: Trung bình mẫu ± sai số chuẩn.

3.4.3. Thời gian nuôi cấy

Tiến hành nuôi cấy chủng Ld3 trong môi trường MRS dịch thể ở pH môi trường và nhiệt độ tối ưu trong 2 - 5 ngày (mục 2.2.5), kết quả cho thấy sinh khối đạt cao nhất sau 2 ngày (Hình 3). So với chủng *L. plantarum* ZZUA493 đối kháng với nấm có thời gian sinh trưởng và phát triển tối ưu là sau 12 giờ [18], chủng Ld3 có

thời gian nuôi cấy tối ưu cho khả năng tạo sinh khối là dài hơn.

Ngoài ra, tại thời điểm nuôi cấy tối ưu, pH của môi trường giảm nhanh chóng. Điều này có thể là do các axit hữu cơ được vi khuẩn lactic sản xuất và tích lũy vào trong môi trường. Đồng thời, đây còn được xem là một trong số cơ chế kháng nấm gây bệnh của vi khuẩn lactic.



Hình 3. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến quá trình tạo sinh khối của chủng Ld3

3.5. Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến hoạt tính kháng nấm của CFS

Để xác định bản chất của các hợp chất chịu trách nhiệm cho hoạt tính kháng nấm, tiến hành thu hồi CFS của chủng Ld3 sau nuôi cấy trong môi trường MRS dịch thể ở điều kiện tối ưu và khảo sát ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến hoạt tính kháng nấm của CFS theo phương pháp đã được nêu ở mục 2.2.6. Kết quả cho thấy, hoạt tính kháng nấm của CFS giảm đáng kể khi được điều chỉnh đến giá trị pH gần trung tính (pH 6,5) (Bảng 4) nhưng không giảm sau xử lý nhiệt (Bảng 5). Tương tự,

Guimarães và cs (2018) đã báo cáo rằng CFS từ hai chủng *L. plantarum* UM55 và *L. buchneri* mất hoạt tính kháng nấm *Penicillium nordicum* ở pH 7,0 (mức độ phát triển của nấm tương tự với đối chứng MRS), tuy nhiên không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa CFS sau xử lý nhiệt ở 121°C và đối chứng CFS không xử lý nhiệt [19]. Vì pH ảnh hưởng rất lớn đến hoạt tính của CFS, có thể suy đoán rằng các axit hữu cơ hiện diện trong CFS đóng một vai trò quan trọng trong tác dụng kháng nấm.

Bảng 4. Hoạt tính kháng nấm của CFS ở các giá trị pH khác nhau

pH	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5
Đường kính vòng ức chế (mm)	35 ^a ± 1	35 ^a ± 1	32 ^b ± 2	26 ^c ± 1	18 ^d ± 3
Hoạt tính còn lại (%)	100	100	91	74	51

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một hàng chỉ sự sai khác trung bình mẫu có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test). $M \pm SE$: Trung bình mẫu $\pm$ sai số chuẩn.

4. KẾT LUẬN

Từ các mẫu quả dâu tây, trên môi trường PDA có bổ sung 1% Chloramphenicol, đã phân lập được các chủng vi khuẩn lactic. Trong số các chủng phân lập được, bằng phương pháp đĩa thạch 2 lớp, đã tuyển chọn được chủng vi khuẩn lactic Ld3 có khả năng đối kháng cao với chủng nấm mốc Nd4 gây thối hỏng quả dâu tây. Đồng thời, đã xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp cho quá trình tạo sinh khối của chủng Ld3 là môi trường MRS dịch thể có pH 6,0, nhiệt độ 30°C và thời gian 2 ngày. Sinh khối thu được từ quá trình lên men chủng Ld3 sẽ là nguồn cung cấp lợi khuẩn cho quá trình sản xuất lớp phủ ăn được chứa lợi khuẩn ứng dụng

trên quả dâu tây sau thu hoạch, nhằm cải thiện chất lượng, chức năng và thời hạn sử dụng quả tươi. Ngoài ra, hoạt tính kháng nấm của CFS từ chủng Ld3 giảm đáng kể ở pH 6,5 nhưng không giảm so với đối chứng sau xử lý nhiệt. Các axit hữu cơ hiện diện trong CFS có thể đóng một vai trò quan trọng trong tác dụng kháng nấm.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tiến hành trong khuôn khổ đề tài QG.22.19 của ĐHQG Hà Nội.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Almenar, E., Del-Valle, V., Hernández-Muñoz, P., Lagarón, J. M., Catalá, R., Gavara, R.

- (2007). Equilibrium modified atmosphere packaging of wild strawberries. *J. Sci. Food Agric*, 87, 1931–1939.
2. Dhital, R., Mora, N. B., Watson, D., Kohli, P., Choudhary, R. (2018). Efficacy of limonene nano coatings on post-harvest shelf life of strawberries. *LWT: Food Sci Technol* 97, 124–134.
3. Hajji, S., Younes, I., Affes, S., Boufi, S., Nasri, M. (2018). Optimization of the formulation of chitosan edible coatings supplemented with carotenoproteins and their use for extending strawberries postharvest life. *Food Hydrocoll* 83, 375–392.
4. Ayala-Zavala, J. F., Wang, S. Y., Wang, C. Y., González-Aguilar, G. A. (2004). Effect of storage temperatures on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit. *Lebensm -Wiss u - Technol* 37, 687–695.
5. Bertolini, P., Baraldi, E., Mari, M., Trufelli, B., Lazzarin, R. (2003). Effects of long term exposure to high- CO₂ during storage at 0°C on biology and infectivity of *Botrytis cinerea* in red Chicory. *J. Phytopathology*, 151, 201–207.
6. Pavli, F., Tassou, C., Nychas, G. J. E., Chorianopoulos, N. (2018). Probiotic incorporation in edible films and coatings: Bioactive solution for functional foods. *Int. J. Mol. Sci.* 19(1), 150. doi: 10.3390/ijms19010150.
7. Guimarães, A., Abrunhosa, L., Pastrana, L. M., Cerqueira, M. A. (2018). Edible films and coatings as carriers of living microorganisms: a new strategy towards biopreservation and healthier foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 17, 594–614.
8. Amin, M., Jorfi, M., Khosravi, A., Samarbafzadeh, A., Sheikh, A. F. (2009). Isolation and identification of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* from plants by PCR and detection of their antibacterial activity. *J. Biol. Sci.* 9, 810–814.
9. Gol, N. B., Patel, P. R., Rao, T. R. (2013). Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan. *Postharvest Biol. Technol.* 85, 185–195.
10. Solairaj, D., Guillaume Legrand, N.N., Yang, Q., Zhang, H. (2020). Isolation of pathogenic fungi causing postharvest decay in table grapes and in vivo biocontrol activity of selected yeasts against them. *Physiol Mol Plant Pathol* 110, 101478. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2020.101478>.
11. Marín, A., Plotto, A., Atarés, L., Chiralt, A. (2019). Lactic acid bacteria incorporated into edible coatings to control fungal growth and maintain postharvest quality of grapes. *HortScience* 54 (2), 337–343.
12. Reiner, K. (2010). Catalase test protocol. American Society for Microbiology. <https://asm.org/Protocols/Catalase-Test-Protocol>.
13. Shields, P., Cathcart, L. (2010). Oxidase test protocol. American Society for Microbiology. <https://asm.org/Protocols/Oxidase-Test-Protocol>.
14. Taroub, B., Salma, L., Manel, Z., Ouzari, H. I., Hamdi Z., Moktar, H. (2019). Isolation of lactic acid bacteria from grape fruit: antifungal activities, probiotic properties, and *in vitro* detoxification of ochratoxin A. *Ann. Microbiol.* 69:17–27.
15. Lorenzini, M., Simonato, B., Favati, F., Bernardi, P., Sbarbati, A., Zapparoli, G. (2018). Filamentous fungi associated with natural infection of noble rot on withered grapes. *Int. J. Food Microbiol.* 272, 83–86.
16. Breitschwerdt, E. B., Linder, K. L., Day M. J., Maggi, R. G., Chomel, B. B., Kempf, V. A. J. (2013). Koch's Postulates and the pathogenesis of comparative infectious disease causation associated with *Bartonella* species. *J. Comp. Pathol.* 148(2), 115–125.
17. Nguyễn Lâm Dũng, Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Thanh Hiền, Phạm Văn Ty (1976). *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học*. Tập II. Nxb Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
18. Zhao, S., Hao, X., Yang, F., Wang, Y., Fan, X., Wang, Y. (2022). Antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* ZZUA493 and its application to extend the shelf life of Chinese Steamed Buns. *Foods* 11, 195. <https://doi.org/10.3390/foods11020195>

19. Guimarães, A., Venancio, A., Abrunhosa, L. Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo (2018). Antifungal effect of organic acids from Risk Assess 35, 1803-1818.
lactic acid bacteria on *Penicillium nordicum*. Food

ISOLATION, SELECTION AND CULTURE OF LACTIC ACID BACTERIUM ANTAGONISTIC TO POSTHARVEST PATHOGENIC FUNGUS IN STRAWBERRIES

Ngo Thi Tuong Chau, Phan Thi Thao Ly,
Nguyen Thi Tu Le, Le Van Thien

Summary

Incorporation of probiotics with edible films or coatings to improve the quality, functionality, shelf life of fresh fruits is one of the latest strategies in the food industry. The aim of this study was to isolate, select lactic acid bacteria (LAB) antagonistic to postharvest pathogenic fungi in strawberries and determine the suitable conditions for their biomass production. Fungi were isolated from decayed strawberries on PDA supplemented with 1% Chloramphenicol at 25°C for 5 - 7 d. LAB were isolated from fresh strawberries on MRS Agar at 37°C for 2 - 3 d. Isolates with antifungal activities were selected using overlay technique. LAB were cultured in MRS Broth at pH 4 - 8, 25 - 40°C for 2 - 5 d. Effects of pH and temperature on the antifungal activity of cell-free supernatant (CFS) were investigated at 4.5 - 6.5 and 60°C, 80°C and 100°C for 2 h, respectively. Results showed that the fungal strain Nd4 was isolated and identified as postharvest pathogen of strawberries with high infection density (1.2×10^3 CFU/g). Among 7 lactic acid bacterial isolates, strain Lb3 with the highest mycelial growth inhibition rate (> 30%) was selected. The suitable culture conditions for biomass production of strain Ld3 were pH 6.0, 30°C for 2 d. Antifungal activity was drastically reduced when the pH of CFS was adjusted to a relatively neutral value of pH 6.5, however no significant reduction of antifungal activity was observed after heat treatment.

Keywords: *Antifungal activity, lactic acid bacteria, postharvest pathogenic fungi, probiotics, strawberry.*

Người phản biện: TS. Huỳnh Ngọc Thanh Tâm

Ngày nhận bài: 01/3/2023

Ngày thông qua phản biện: 28/3/2023

Ngày duyệt đăng: 4/4/2023