

STUDY ON ISOLATION AND SELECTION OF HEAT-RESISTANT LACTIC BACTERIA FROM THE NATURAL FERMENTED RESOURCES

Tran Van Chi*, Luu Hong Son, Pham Thi Tuyen Mai, Dinh Thi Kim Hoa, Tran Lam Oanh

TNU - University of Agriculture and Forestry

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 13/6/2022	The study aims to isolate and select lactic acid bacteria strains with good thermotolerant capacity. The study isolated six strains of lactic acid bacteria from natural fermented resources. Among these bacterial strains, one strain of lactic acid bacteria with the highest lactic acid fermentation activity and the best heat resistance was selected. Specifically, the selected bacterial strain after being fermented in MRS medium for 36 hours at 47°C produced the lactic acid concentration of 1.75 mg/ml. Besides, the selected bacterial strain is also capable of growing at 51°C. The identification of selected bacteria based on the comparison results of 16Sr RNA gene sequence produced the similarity rate with <i>Lactiplantibacillus pentosus</i> species of 100%. Research results also show that if cultured in an MRS medium, the growth curve of <i>Lactiplantibacillus pentosus</i> strain is divided into 4 phases: starting phase (0-3) hours, growing phase [3-27) hours, equilibration phase from [27-33] hours, the decline phase after 33 hours of culture.
Revised: 20/7/2022	
Published: 20/7/2022	
KEYWORDS	
Bacteria	
Lactic	
Fermentation	
Isolation	
Select	

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CHỦNG VI KHUẨN LACTIC CHỊU NHIỆT TỪ NGUỒN LÊN MEN TỰ NHIÊN

Trần Văn Chí*, Lưu Hồng Sơn, Phạm Thị Tuyết Mai, Đinh Thị Kim Hoa, Trần Lâm Oanh

Trường Đại học Nông Lâm – ĐH Thái Nguyên

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 13/6/2022	Với mục tiêu tuyển chọn được chủng vi khuẩn lactic có khả năng chịu nhiệt tốt, nghiên cứu đã phân lập được 6 chủng vi khuẩn lactic từ nguồn lên men chua tự nhiên. Từ đó tuyển chọn được 1 chủng có hoạt tính lên men sinh axit lactic cao nhất, đồng thời có khả năng chịu nhiệt độ tốt nhất. Theo đó, chủng vi khuẩn tuyển chọn sau khi được lên men trong môi trường MRS trong 36 giờ ở 47°C cho hàm lượng axit lactic sinh ra 1,75 mg/ml. Bên cạnh đó, chủng tuyển chọn còn có khả năng phát triển ở 51°C. Đã định danh đến loài chủng vi khuẩn được tuyển chọn dựa vào kết quả so sánh trình tự gen 16Sr RNA, tỷ lệ tương đồng với loài <i>Lactiplantibacillus pentosus</i> là 100%. Kết quả nghiên cứu cũng chỉ ra nếu nuôi cấy trong môi trường MRS thì đường cong sinh trưởng của chủng <i>Lactiplantibacillus pentosus</i> được chia thành 4 pha: Pha bắt đầu (0-3) giờ, pha sinh trưởng [3-27) giờ, pha cân bằng từ [27-33] giờ, pha suy vong sau 33 giờ nuôi. Kết quả của nghiên cứu là cơ sở khoa học quan trọng góp phần đa dạng hóa nguồn giống tốt phục vụ sản xuất axit lactic cũng như trong sản xuất thực phẩm lên men.
Ngày hoàn thiện: 20/7/2022	
Ngày đăng: 20/7/2022	
TỪ KHÓA	
Vi khuẩn	
Acid Lactic	
Lên men	
Phân lập	
Tuyển chọn	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.6160>

* Corresponding author. Email: tranvanchi@tuaf.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Đã từ lâu, axit lactic được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau như bảo quản và chế biến thực phẩm, trong y học, môi trường [1], [2]. Quá trình lên men axit lactic mang lại hiệu quả tốt hơn tổng hợp công nghiệp. Trong tự nhiên, lên men axit lactic là một trong các quá trình tái tạo năng lượng kỵ khí thông dụng nhất được thực hiện bởi vi khuẩn lactic [3],[4],[5]. Vi khuẩn lactic thường tồn tại trong môi trường sống giàu chất dinh dưỡng như thịt, sữa, phô mai, đồ uống. Chúng cũng có thể được phân lập từ các nguyên liệu tự nhiên như rau, hoa quả, các loại thực phẩm lên men chua... [3]. Ở Việt Nam, vi khuẩn lactic xuất hiện chủ yếu trong các sản phẩm lên men truyền thống như dưa cải muối, sữa chua, cơm mẻ...[6],. Trong số các vi sinh vật được ứng dụng vào sản xuất thực phẩm, hệ vi khuẩn lactic được nghiên cứu nhiều nhất [7]

Ngày nay, việc lên men sản xuất axit lactic được áp dụng phổ biến trên quy mô công nghiệp với các hệ thống lên men lớn nhưng thường gặp phải trở ngại về đầu tư thiết bị ổn nhiệt nhằm ổn định nhiệt độ do vi sinh vật sinh ra khi hô hấp và do chính từ thiết bị lên men tỏa ra [8]. Nếu có được chủng vi khuẩn lactic chịu nhiệt ứng dụng trong sản xuất sẽ làm giảm chi phí và năng lượng tiêu tốn. Tuy nhiên, đến nay số lượng nghiên cứu về các chủng vi khuẩn lactic chịu nhiệt độ cao còn hạn chế. Do vậy, việc tuyển chọn các chủng vi khuẩn lactic chịu nhiệt có tiềm năng rất lớn trong lên men sản xuất axit lactic quy mô công nghiệp.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu: Các chủng vi khuẩn lactic được phân lập từ nguồn lên men chua tự nhiên như: dưa cải, dưa hành, nước đậu chua.

2.2. Môi trường MRS: (De Man, Rogosa and Sharpe) gồm: peptone (10,0 g/L), cao thịt (8,0 g/L), cao nấm men (4,0 g/L), D-glucose (20,0 g/L), K_2HPO_4 (2,0 g/L), Tween 80 (1,0 g/L), di-ammonium citrate (2,0 g/L), Natri acetate (5,0 g/L), $MgSO_4$ (0,2 g/L) và $MnSO_4$ (0,04 g/L) [9].

2.3. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp phân lập: Dịch mẫu thu về được pha loãng đến 10^{-4} với nước cất vô trùng rồi cấy trải trên môi trường MRS thạch đĩa, ủ lật úp đĩa trong 48 giờ ở $37^\circ C$. Sau 48 giờ, chọn những khuẩn lạc tiêu biểu để cấy chuyển nhiều lần đến khi tất cả khuẩn lạc mọc trên đĩa giống nhau, sau đó quan sát dưới kính hiển vi quang học nếu tế bào vi khuẩn có hình thái đồng nhất thì kết luận chủng đạt mức độ thuần.

- Phương pháp cấy truyền và giữ giống thực hiện theo Trần Văn Khánh (2007) [10].

- Phương pháp quan sát hình thái tế bào trên kính hiển vi theo Trần Linh Thuốc (2007) [9].

- Tuyển chọn chủng dựa vào khả năng chịu nhiệt độ cao khi lên men của vi khuẩn ở các mức nhiệt độ 32, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, $53^\circ C$. Sau 48 giờ lên men trên môi trường MRS với các mức nhiệt độ trên, tiến hành đánh giá sự mọc lên của tế bào vi khuẩn kiểm định trên môi trường thạch đĩa và xác định khả năng sinh axit lactic theo phương pháp của Đào Thị Lương và cộng sự (2010) [11].

- Định lượng tế bào vi khuẩn bằng phương pháp đo độ hấp thụ quang học trên máy quang phổ UV-Vis bước sóng 620 nm [11].

- Định danh đến loài vi khuẩn bằng sinh học phân tử, thông qua tách chiết DNA tổng số [11], điện di trên gel agarose [12], sản phẩm PCR sau khi được khuếch và tinh sạch sẽ được gửi đi giải trình tự ở công ty 1st BASE tại Selangor, Malaysia. Phương pháp giải trình tự tự động theo nguyên lý Sanger. Trình tự gene 16S rRNA của mẫu nghiên cứu sau khi giải trình tự được so sánh với trình tự các trình tự 16S rRNA đã được công bố trên ngân hàng gen của trang web NCBI hoặc Eztaxon.

- Xử lý số liệu bằng phần mềm SPSS20.

3. Kết quả và thảo luận

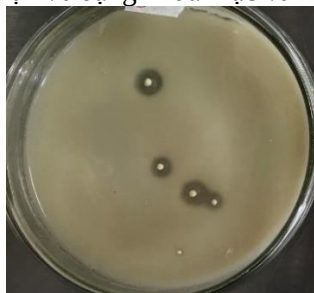
3.1. Phân lập các chủng vi khuẩn lactic từ nguồn lên men tự nhiên

Từ 5 mẫu nước dưa bắp cải, 5 mẫu nước dưa hành, 2 mẫu nước chua làm đậu phụ và 4 mẫu nước dưa cải bẹ thu thập trên địa bàn thành phố Thái Nguyên, tiến hành pha loãng, cấy trải trên môi trường thạch đĩa MRS, ủ trong 48 giờ ở 30°C. Khi xuất hiện khuẩn lạc có vòng phân giải CaCO_3 tiếp tục thuần bằng cách tách riêng rẽ và cấy lại nhiều lần trên môi trường thạch đĩa MRS cho đến khi khuẩn lạc mọc lên đồng nhất [15]. Với 16 mẫu dịch lên men chua ban đầu đã phân lập được 6 chủng vi khuẩn nghi là vi khuẩn lactic. Kết quả thể hiện tại bảng 1.

Bảng 1. Kết quả phân lập vi khuẩn lactic từ nguồn lên men tự nhiên

STT	Nguồn mẫu	Kí hiệu chủng	Hình dạng khuẩn lạc	Hình thái tế bào
1	Nước dưa bắp cải	L1	Tròn nổi, trắng sữa, trơn bóng, không rìa	Hình que ngắn
2		L2	Tròn nổi, trắng ngà, trơn bóng, không rìa	Hình cầu xếp
3	Nước dưa hành	L3	Tròn dẹt giữa, trắng sữa, bóng, mép phẳng	Hình cầu
4	Nước đậu chua	L4	Tròn dẹt, trắng sữa, trơn, mép răng cưa	Hình que ngắn
5		L5	Tròn nổi, trắng sữa, trơn bóng, có rìa	Hình cầu xếp
6	Nước dưa cải bẹ	L6	Tròn nổi, trắng đục, mép răng cưa	Hình que ngắn

Kết quả bảng 1 cho thấy, trong số 16 mẫu nước lên men chua tự nhiên có 4 loại mẫu nước qua quá trình phân lập đã thu được dạng 6 khuẩn lạc và hình thái tế bào có nhiều đặc điểm của vi khuẩn lactic. Đó là các khuẩn lạc hình tròn nổi, màu trắng sữa hoặc đục, nhẵn bóng, mép có răng cưa hoặc không, có vòng phân giải CaCO_3 xung quanh. Các tế bào hình cầu xếp cụm hoặc hình que ngắn, hình cầu. Trên hình 1a – hình thái khuẩn lạc chủng L1 và 1b – hình thái tế bào chủng L1 như một đại diện về dạng khuẩn lạc và hình thái tế bào của các chủng đã phân lập được.



Hình 1 a. Hình thái khuẩn lạc chủng L1 **Hình 1 b.** Hình thái tế bào chủng L1

Những khuẩn lạc nghi ngờ là vi khuẩn lactic này được giữ giống trong ống thạch nghiêng chứa môi trường MRS sau khi đã nuôi trong tủ ấm ở nhiệt độ 30°C sau 48 giờ, giữ trong tủ lạnh 3 – 5°C và định kỳ cấy chuyển 3 tuần/lần để sử dụng cho các nội dung nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic sinh axit lactic cao và chịu nhiệt tốt

3.2.1. Đánh giá khả năng lên men ở nhiệt độ cao của các chủng đã phân lập

Như đã trình bày trong các phần trên, điều kiện lên men quy mô lớn trong các hệ thống lên men gặp nhiều trở ngại chủ yếu ở nhiệt lượng sinh ra làm tăng nhiệt độ lên men, gây ức chế vi sinh vật, đặc biệt là vi khuẩn lactic do nhiệt độ tối ưu cho sự phát triển và sinh sản của vi khuẩn lactic thường không cao hơn 40°C. Do đó, các nhà máy sản xuất đã tốn kém nhiều chi phí xây dựng các hệ thống làm mát, việc này mang lại hiệu quả hạn chế và tốn kém nhiều năng lượng. Nhằm đáp ứng mục tiêu của nghiên cứu này, các chủng vi khuẩn đã phân lập được khảo sát khả năng lên men lactic trong các điều kiện nhiệt độ khác nhau, bước đầu sàng lọc những chủng có khả năng chịu nhiệt tốt. Kết quả đánh giá khả năng lên men ở nhiệt độ cao của các chủng đã phân lập được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2. Kết quả đánh giá khả năng chịu nhiệt của các chủng vi khuẩn lactic

Chủng	Nhiệt độ (°C)								
	37	39	41	43	45	47	49	51	53
L1	+	+	+	+	+	+	+	+	–
L2	+	+	+	+	+	–	–	–	–
L3	+	+	+	+	+	+	+	–	–
L4	+	+	+	–	–	–	–	–	–
L5	+	+	+	+	+	–	–	–	–
L6	+	+	+	+	+	+	–	–	–

Chú thích: (+): phát triển khuẩn lạc; (–): không phát triển khuẩn lạc

Bảng 2 cho thấy tất cả các chủng vi khuẩn đều phát triển được ở nhiệt độ 37°C đến 41°C. Có 5/6 chủng phát triển được ở nhiệt độ 43°C và 45°C. Theo Jenkins (2005), vi khuẩn chịu nhiệt (*Thermophilic*) có khả năng sống trên 45°C, vi khuẩn lactic ưa nhiệt trung bình (*Mesophilic*) có thể sống ở dải nhiệt độ từ 20–45°C [13]. Như vậy, L2, L4 và L5 được xếp vào nhóm vi khuẩn ưa nhiệt trung bình; chủng L1, L3 và L6 phát triển được ở 47°C trở lên nên được xếp vào nhóm chịu nhiệt tốt (ưa nhiệt). Trong đó, các chủng L1 và L3 là những chủng vi khuẩn chịu nhiệt có thể sống và phát triển ở nhiệt độ đến 49°C. Riêng chủng L1 là chủng có khả năng chịu được nhiệt độ ở mức 51°C, cao hơn so với các chủng còn lại và cao hơn cả các chủng chịu nhiệt được công bố bởi Ngô Thị Phương Dung và cộng sự (2017) [6].

3.2.2. Đánh giá khả năng sinh axit lactic của các chủng đã phân lập

Mục tiêu của nghiên cứu này là tuyển chọn được chủng vi khuẩn lactic của khả năng sinh acid lactic cao và chịu nhiệt tốt. Do vậy, những chủng vi khuẩn đã sàng lọc sơ bộ về khả năng lên men chịu nhiệt ở trên được tiến hành khảo sát khả năng sinh axit lactic theo thời gian lên men để tuyển chọn chủng tốt nhất bằng cách nuôi cấy 3 chủng đã qua sàng lọc trong môi trường lỏng MRS ở nhiệt độ 47°C. Kết quả xác định khả năng sinh axit lactic của 3 chủng đã qua sàng lọc sơ bộ được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3. Kết quả đo hàm lượng axit lactic sinh ra bởi các chủng vi khuẩn

Chủng vi khuẩn	Hàm lượng axit lactic sinh ra theo thời gian lên men (mg/ml)		
	24 giờ	36 giờ	48 giờ
L1	0,923 ^a	1,750 ^a	1,560 ^a
L3	0,675 ^c	1,000 ^c	1,070 ^c
L6	0,778 ^b	1,430 ^b	1,440 ^b

Ghi chú: Trên cùng 1 cột các giá trị mang cùng chữ số mũ thì khác nhau không có ý nghĩa ở mức $\alpha = 0,05$

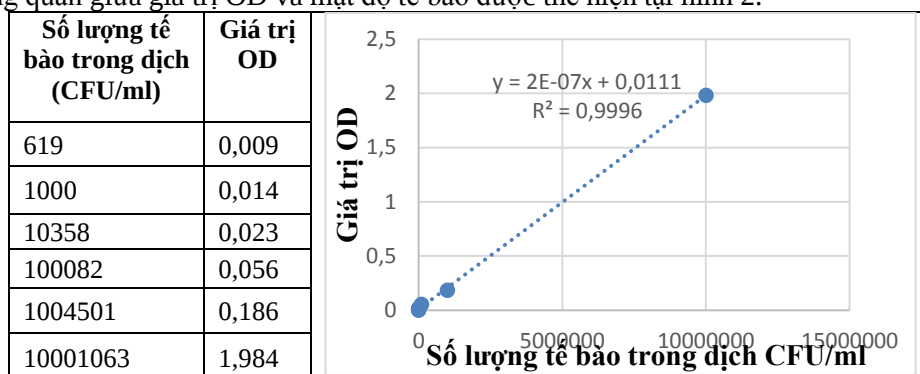
Kết quả ở bảng 3 cho thấy cả 3 chủng vi khuẩn đã qua sàng lọc đều có khả năng sinh axit lactic. Sau 48 giờ lên men, L1 là chủng có khả năng sinh axit lactic cao nhất (1,56 mg/ml) và L3 là chủng có khả năng sinh axit lactic thấp nhất (1,14 mg/ml). Bên cạnh đó, theo thời gian lên men, hàm lượng acid lactic đo được đạt giá trị cao nhất khác nhau với các chủng khác nhau. Các chủng L1 cho khả năng sinh axit lactic lớn nhất sau 36 giờ lên men, trong khi đó chủng L3 và L6 là 48 giờ. Hàm lượng acid lactic các chủng tổng hợp được sau 24 giờ thấp hơn rất nhiều so với khi xác định ở 36 giờ lên men, nhưng sau 48 giờ có sự thay đổi rất nhỏ. Nguyên nhân là do sau 24 giờ, mật độ tế bào vi khuẩn trong môi trường lên men chưa đạt giá trị tối đa, trong khoảng thời gian sau 24 -36 giờ nuôi cấy là khoảng thời gian mà mật độ tế bào vi khuẩn đã nằm trong pha cân bằng, do vậy hiệu quả chuyển hóa đường thành acid lactic sẽ cao hơn. Và giai đoạn sau 36-48 giờ lên men thì hệ nuôi cấy vi khuẩn có thể đã nằm trong pha suy vong, do vậy hiệu quả chuyển hóa thành axit lactic thấp. Điều này phù hợp với ghi nhận của Nguyễn Lâm Dũng và cộng sự (1972) [13]: “Yếu tố thời gian nuôi cấy cũng sẽ có ảnh hưởng đến việc tăng số lượng tế bào vi khuẩn. Để

chuyển hoá được hết nguồn dinh dưỡng thành acid lactic, vi khuẩn cần phải có một khoảng thời gian nhất định”. Theo kết quả trình bày ở trên, chủng khuẩn lactic L1 tốt nhất, đạt các giá trị yêu cầu của mục tiêu đề ra. Do đó, chủng L1 được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.2.3. Đánh giá động thái sinh trưởng của chủng tuyển chọn

3.2.3.1. Xây dựng đường chuẩn mật độ tế bào vi khuẩn tương quan với độ hấp thụ ánh sáng

Sau khi nuôi cấy tăng sinh dịch huyền phù chứa vi sinh vật được pha loãng và đo độ hấp thụ quang học (OD). Đồng thời ở mỗi độ pha loãng tiến hành cấy trải trên môi trường thạch đĩa để xác định số lượng tế bào ứng với độ pha loãng đó. Kết quả xây dựng phương trình đường chuẩn mỗi tương quan giữa giá trị OD và mật độ tế bào được thể hiện tại hình 2.



Hình 2 Đường chuẩn tương quan giữa giá trị OD và mật độ tế bào

Kết quả trên hình 2 cho thấy, sau 36 giờ nuôi cấy, mật độ tế bào vi khuẩn đạt khoảng 10^7 tế bào/ml. Đồng thời, phương trình thể hiện mối tương quan giữa độ hấp thụ quang học và mật độ tế bào có giá trị hồi quy $R^2 = 0,9996$, đạt yêu cầu ($\geq 0,95$) và có độ tin cậy cao để tiếp tục tiến hành nghiên cứu xây dựng đường cong tăng sinh của chủng L1.

3.2.3.2. Xây dựng đường cong sinh trưởng của chủng vi khuẩn

Một chủng vi sinh vật nếu được nuôi cấy trong hệ kín sẽ phát triển theo 4 giai đoạn (bắt đầu, phát triển, cân bằng động và suy vong) [14], [16]. Việc xác định động thái sinh trưởng của chủng vi khuẩn có vai trò quan trọng góp phần xác định thời gian kết thúc giai đoạn tăng sinh để bước vào giai đoạn sản xuất. Do vậy, xây dựng động thái sinh trưởng của chủng L1 để có được những thông tin hữu ích bổ sung vào cơ sở dữ liệu về chủng và hướng đến ứng dụng trong sản xuất. Kết quả nghiên cứu động thái sinh trưởng của chủng L1 được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4. Động thái sinh trưởng của chủng L1

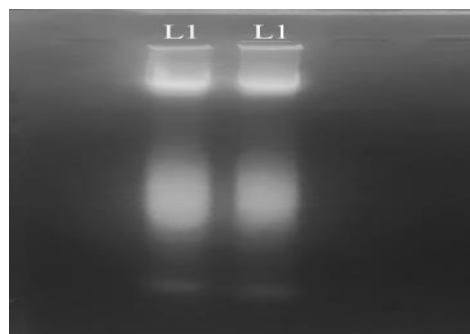
Thời gian nuôi cấy	Mật độ tế bào	Đường cong sinh trưởng
0	13500	
3	603500	
6	2378500	
9	6143500	
12	7443500	
15	7998500	
18	8568500	
21	9373500	
24	9658500	
27	9753500	
30	10168500	
33	9798500	
36	9713500	

Kết quả thí nghiệm được thể hiện trong bảng 4 cho thấy mật độ tế bào chủng L1 tăng theo thời gian nuôi cấy. Mật độ tế bào vi sinh vật phát triển mạnh trong khoảng 3 – 24 giờ và tiệm cận pha cân bằng động trong khoảng 27 - 33 giờ nuôi, trong đó đáng chú ý tại thời điểm 30 giờ, mật độ tế bào đạt giá trị lớn nhất khoảng 10^7 , sau đó mật độ tế bào có khuynh hướng giảm. Căn cứ vào đồ thị trên, thấy rõ động thái sinh trưởng của chủng L1 và có thể chia 4 giai đoạn của đường cong sinh trưởng theo thời gian như sau: Giai đoạn bắt đầu từ (0-3) giờ, giai đoạn phát triển từ (3-24) giờ, giai đoạn cân bằng động từ sau (24 – 33) giờ, giai đoạn suy vong sau 33 giờ nuôi cấy.

3.3. Định danh đến loài chủng vi khuẩn tuyển chọn

3.3.1. Kết quả tách DNA tổng số

Điều quan tâm hàng đầu của kỹ thuật tách chiết acid nucleic là thu nhận các phân tử ở trạng thái nguyên vẹn không bị phân hủy bởi các tác nhân cơ học hoặc bị đứt gãy, đó là điều kiện đầu tiên quyết định cho sự thành công của quá trình nghiên cứu. Kết quả tách chiết DNA tổng số chủng vi khuẩn lactic được thể hiện như trên hình 3.

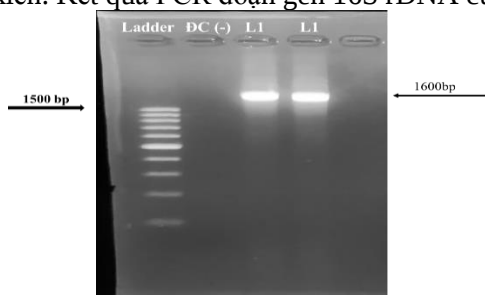


Hình 3. Kết quả tách chiết DNA tổng số mẫu vi khuẩn lactic L1

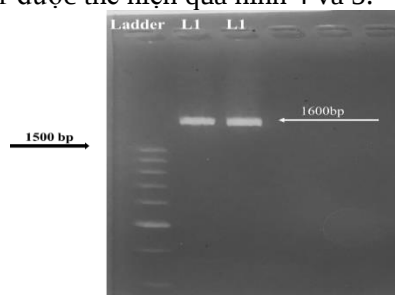
Từ kết quả trên cho thấy các mẫu DNA tổng số thu được có chất lượng tương đối tốt: DNA ít bị đứt gãy, các band sáng đều. Tuy nhiên, độ tinh sạch của DNA còn thấp, nhiều sản phẩm phụ.

3.3.2. Kết quả PCR

PCR là quá trình nhân một đoạn DNA lặp đi lặp lại. Sức mạnh của PCR là khả năng nhân bản một trình tự DNA xác định từ một số lượng nhỏ ban đầu lên một số lượng rất lớn trong một thời gian ngắn. Sản phẩm của phản ứng PCR là nguyên liệu cho quá trình giải trình tự gen và định danh nên cần đảm bảo tinh sạch, không lẫn sản phẩm phụ, kích thước tương đồng với trình tự gen dự kiến. Kết quả PCR đoạn gen 16S rDNA của chủng L1 được thể hiện qua hình 4 và 5.



Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm PCR với trình tự gen 16S rRNA



Hình 5 Kết quả điện di sản phẩm PCR sau khi tinh sạch

Từ kết quả trên cho thấy gen 16S rDNA dùng trong việc định danh được khuếch đại thành công. Sản phẩm PCR chỉ cho một băng duy nhất, không xuất hiện sản phẩm phụ. Đối chiếu với

thành DNA chuẩn, sản phẩm khuếch đại có kích thước như dự kiến: khoảng 1600bp. Như vậy, sản phẩm PCR đủ điều kiện để có thể giải trình tự.

3.3.3. Kết quả giải trình tự

Chuỗi trình tự nucleotide của chủng L1 được giải trình tự tại vùng gen 16S rRNA đạt 1441 nucleotide.

ATGCAAGTCGAACGAACCTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAG
TGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAAC
ACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGA
AAGATGGCTTCCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGG
GGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCAC
ATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC
ACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCT
CGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGACATATCTGAGAGTAACTGTTTCAGGTATTGAC
GGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA
GGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAA
GTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTT
GAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAT
GGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCG
AAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATG
AATGCTAAGTGTGAGGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCAT
TCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCG
CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTC
TTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAG
GTGGTGCATGGTTGTCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACG
AGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCC
GGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACC
TGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTA
AGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGA
AGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC
TTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCCAAAGTCGGTGGGGTA
ACCTTTTAGGAACCGCCGCTAAG

Trình tự trên được so sánh với dữ liệu được công bố trên Eztaxon, kết quả so sánh được thể hiện trên hình 6.

Select hits by database							All	Valid names only	Excel	FASTA	EzEditor2	
Tasks	Hit taxon name	Hit strain name	Accession	Similarity	Variation ratio	Hit taxonomy	Completeness (%)					
☒	Lactiplantibacillus pentosus	DSM 20314(T)	AZCU01000047	100.00	0/1441	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae;Lactiplantibacillus	100.0					
☒	Lactiplantibacillus argentoratensis	DSM 16365(T)	CP032751	99.93	1/1441	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae;Lactiplantibacillus	100.0					
☒	Lactiplantibacillus plantarum	ATCC 14917(T)	ACG201000098	99.93	1/1441	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae;Lactiplantibacillus	100.0					
☒	Lactiplantibacillus paraplantarum	DSM 10667(T)	AJ306297	99.79	3/1441	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae;Lactiplantibacillus	100.0					
☒	CM001538_s	KCA1	CM001538	99.79	3/1441	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae;Lactiplantibacillus	100.0					
☒	Lactiplantibacillus paraplantarum	DSM 10667(T)	CP032744	99.72	4/1441	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae;Lactiplantibacillus	100.0					
☒	Lactiplantibacillus daoliensis	116-1A(T)	LC438516	99.16	12/1428	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae;Lactiplantibacillus	96.8					
☒	Lactiplantibacillus pingfangensis	382-1(T)	LC438521	99.16	12/1424	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae;Lactiplantibacillus	95.8					
☒	Lactiplantibacillus nangangensis	381-7(T)	LC438520	99.09	13/1423	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae;Lactiplantibacillus	96.2					

Hình 6. Kết quả so sánh trình tự gen của chủng L1 với dữ liệu trên Eztaxon

Kết quả so sánh cho thấy, đoạn gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn L1 có độ tương đồng 100% với chủng *Lactiplantibacillus pentosus*. Từ kết quả trên cho thấy, chỉ thị phân loại vùng gene 16S rDNA có tính bảo thủ rất cao, chứng tỏ vùng gen bảo thủ của chủng *Lactiplantibacillus pentosus* là rất ít biến đổi. Điều này có thể được biểu hiện qua khả năng lên men trong môi trường khắc nghiệt nhưng vẫn thể hiện được đặc tính chịu nhiệt, chịu acid cao của chủng.

4. Kết luận

Từ 16 mẫu nước lên men chua tự nhiên đã phân lập được 6 chủng vi khuẩn lactic, trong đó 3 chủng có khả năng lên men ở nhiệt độ từ 47°C. Tuyển chọn được chủng L1 có khả năng lên men từ 47-51°C, khi khảo sát lên men ở 47°C hàm lượng axit lactic thu được 1,75 mg/ml, đường cong sinh trưởng của chủng được chia thành 4 pha: Pha bắt đầu (0-3) giờ, pha sinh trưởng [3-27] giờ, pha cân bằng từ [27-33] giờ, pha suy vong sau 33 giờ nuôi. Đã giải trình tự 16SrRNA và so sánh trình tự trên Eztaxon, mức độ tương đồng với chủng *Lactiplantibacillus pentosus*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] S. P. Chahal, *Lactic acid*. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Widnes: Croda Colloids Ltd, 2000.
- [2] J. D. De Man, M. Rogosa, and M. E. Sharpe, "A Medium for the Cultivation of Lactobacilli," *The Journal of Applied Bacteriology*, vol. 23, pp. 130-135, 1960.
- [3] J. J. Doyle and J. L. Doyle, "Isolation of plant DNA from fresh tissue," *Focus*, vol. 12, p. 13, 1990.
- [4] J. C. Jenkins, *The Humanure Handbook: A guide to Composting Human Manure*. Inc.; 3rd edition, 2005.
- [5] A. Lars and A. Siv, *Lactic acid bacteria*. Applied Microbial Systematics, Springer, Dordrecht, pp. 367-388, 2000.
- [6] T. P. D. Ngo, H. D. L. Bui, N. P. T. Hoang, N. T. Nguyen, and X. P. Huynh, "Selection of heat-resistant lactic acid bacteria and their application in lactic acid production," *Journal of Science and Technology - Vietnamese technology*, vol. 14, no. 3B, pp. 58-64, 2017.
- [7] T. T. N. Truong, T. M. T. Le, N. H. Tran, T. M. T. Nguyen, H. A. Mai, N. T. Nguyen, H. D. L. Bui, X. P. Huynh, "Isolation and selection of lactic acid bacteria and their application in the fermentation of fermented rice straw mushroom (*Volvariella volvacea*)," *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 225, no. 01, pp. 3-10, 2020.
- [8] H. D. L. Bui, X. P. Huynh, N. T. Nguyen, and T. P. D. Ngo, "Isolation and selection of heat-resistant lactic acid bacteria from agricultural by-products," *Science Journal of Dong Thap University*, no. 31 pp. 91-97, 2018.
- [9] L. T. Tran, *Microbiological analysis in water, food and cosmetics*. Education publisher, 2007.
- [10] V. K. Tran, *Selection of suitable lactic acid bacteria strains for high quality probiotics*. University of Natural Sciences, Vietnam National University, Ho Chi Minh City, 2007.
- [11] T. L. Dao, T. A. D. Nguyen, T. K. Q. Nguyen, T. L. Q. Tran, and V. H. Duong, "Isolation and selection of lactic acid bacteria used in the processing and preservation of forage and agricultural by-products for ruminants," *Genetics and Applications – Journal of Biotechnology*, no. 6, pp. 1-6, 2010.
- [12] V. C. Duong and H. T. Nguyen, *Textbook of principles of genetic engineering*. Hanoi Agricultural Publishing House, 2017.
- [13] L. D. Nguyen, X. L. Doan, P. T. Nguyen, and V. T. Pham, *Some research methods of microbiology, volume 1*. Hanoi Science and Technology Publishing House, 1972.
- [14] D. L. Nguyen, *Microbiological technology, volume 2 – Industrial Microbiology*, National University Press, Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh, 2014.
- [15] N. T. T. Le and M. N. Pham, "Isolation and investigation of factors affecting the ability to produce antibacterial compounds of *Lactobacillus plantarum*," *Biology Journal*, vol. 36, no. 1, pp. 97-106, 2014.
- [16] T. P. D. Ngo, T. Y. L. Huynh, and X. P. Huynh, "Isolation and selection of lactic acid bacteria capable of producing antibacterial substances," *Journal of Science - Can Tho University*, vol. 19a, pp. 176-184, 2011.