

ISOLATION AND SELECTION OF LACTIC ACID BACTERIA WITH BIOLOGICAL ACTIVITY FROM RAW COW MILK

Nguyen Kim Thuy*, Tran Lien Ha

School of Chemistry and Life Sciences – Hanoi University of Science and Technology (HUST)

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 30/11/2024	Probiotic products with health-protecting effects are becoming increasingly popular. One of the microorganisms that are commonly researched and applied to produce probiotics is lactic acid bacteria. Lactic bacteria are considered safe and have great biological potential in the production of probiotic products for human health. In this study, raw cow's milk was chosen as the source for isolation. 88 lactic acid bacteria strains were isolated from two freshly milked raw cow milk samples. Among them, 5 strains capable of producing β -galactosidase enzyme activity and exopolysaccharides were tested for antibacterial activity. The results revealed that all 5 strains exhibited inhibitory activity against the 5 indicator bacteria. The SBVV2.2 strain had the strongest bacteriocin production ability against five indicator strains: <i>Bacillus cereus</i> ATCC11778 (7.2 mm), <i>Escherichia coli</i> ATCC25922 (10 mm), <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC19111 (8.8 mm), <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923 (4.0 mm), and <i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC14028 (12 mm). When pepsin was added to the fermentation broth, the activity of bacteriocin of SBVV2.2 strain decreased significantly. In addition, species identification at the molecular level of the SBVV2.2 strain was performed via 16S rRNA sequencing and phylogenetic tree analysis. As a result, the isolated strain showed 100% similarity to the <i>Lactobacillus plantarum</i> NWAUFU1072 strain recorded in the NCBI gene bank. The strain was named <i>Lactobacillus plantarum</i> SBVV2.2.
Revised: 27/3/2025	
Published: 28/3/2025	
KEYWORDS	
β -galactosidase	
Bacteriocin	
Lactic acid bacteria	
Raw cow milk	
Exopolysaccharide	

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN LACTIC CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC TỪ SỮA BÒ VỪA THU HOẠCH

Nguyễn Kim Thủy*, Trần Liên Hà

Trường Hóa học và Khoa học sự sống – Đại học Bách khoa Hà Nội

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 30/11/2024	Các chế phẩm probiotic với tác dụng hỗ trợ tăng cường sức khỏe cũng như nâng cao tuổi thọ con người ngày càng phổ biến. Một trong những vi sinh vật thường được ứng dụng để sản xuất probiotic là vi khuẩn lactic. Vi khuẩn lactic được đánh giá là an toàn và có tiềm năng sinh học rất lớn trong việc sản xuất chế phẩm probiotic đối với sức khỏe con người. Trong nghiên cứu này, sữa bò được chọn làm nguồn phân lập. 88 khuẩn lạc vi khuẩn lactic được phân lập từ 2 mẫu sữa bò vừa thu hoạch. Trong số đó, 5 chủng có khả năng sinh β -galactosidase và exopolysaccharide được tiến hành thử nghiệm kháng khuẩn. Kết quả cả 5 chủng đều thể hiện hoạt tính ức chế 5 chủng vi khuẩn kiểm định. Trong đó, chủng SBVV2.2 có khả năng sinh bacteriocin mạnh nhất đối với 5 chủng chỉ thị là <i>Bacillus cereus</i> ATTC11778 (7,2 mm), <i>Escherichia coli</i> ATTC25922 (10 mm), <i>Listeria monocytogenes</i> ATTC19111 (8,8 mm), <i>Staphylococcus aureus</i> ATTC25923 (4,0 mm), <i>Salmonella Typhimurium</i> ATTC14028 (12 mm). Khi bổ sung pepsin vào dịch lên men thì hoạt tính bacteriocin chủng SBVV2.2 giảm mạnh. Định danh chủng SBVV2.2 bằng phương pháp sinh học phân tử 16S rRNA cho thấy sự tương đồng 100% với chủng <i>Lactobacillus plantarum</i> NWAUFU1072, tên chủng được đặt là <i>Lactobacillus plantarum</i> SBVV2.2.
Ngày hoàn thiện: 27/3/2025	
Ngày đăng: 28/3/2025	
TỪ KHÓA	
β -galactosidase	
Bacteriocin	
Vi khuẩn lactic	
Sữa bò vừa thu hoạch	
Exopolysaccharide	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.11630>

* Corresponding author. Email: thuy.nk200621@hust.edu.vn

1. Giới thiệu

Các chế phẩm sinh học nhằm cải thiện và tăng cường sức khỏe con người được tạo ra ngày càng nhiều. Probiotic là một trong những chế phẩm sinh học được tạo ra từ việc ứng dụng những vi sinh vật có lợi bổ sung vào hệ tiêu hóa của người.

Các loài vi khuẩn lactic (LAB) có những đặc tính ưu việt phù hợp cho việc tạo chế phẩm probiotic như: khả năng sống sót và phát triển tốt trong điều kiện bất lợi ở đường tiêu hóa của người như axit mật, pH thấp, kháng khuẩn,... [1]. Tác dụng điển hình của vi khuẩn lactic là hỗ trợ điều trị các chứng bệnh rối loạn đường tiêu hóa, giúp cân bằng hệ tiêu hóa, sản sinh ra nhiều hoạt chất kháng khuẩn như axit lactic, bacteriocin, diacetyl,... [1] và khắc phục hiện tượng kháng kháng sinh, giúp đồng hóa lactose trong sữa uống đối với các bệnh nhân không có khả năng dung nạp lactose trong sữa [2].

Nhiều chủng LAB được biết đến là có khả năng sinh tổng hợp exopolysaccharide (EPSs), những hợp chất polymer có tác dụng cải thiện cấu trúc của các sản phẩm lên men [3]. EPSs là những tác nhân làm đặc, ổn định kết cấu, nhũ hóa, tạo gel... Hơn nữa, gần đây những hoạt tính sinh học khác nhau liên quan đến EPS như khả năng chống oxy hóa, chống ung thư, làm giảm cholesterol,... cũng đã được biết đến [4].

Sữa dùng hàng ngày để bổ sung chất dinh dưỡng, giải khát và làm đẹp, những sản phẩm lên men từ sữa cũng rất được ưa chuộng. Lactose là một loại đường trong những sản phẩm làm từ sữa, hiếm thấy ở các thực phẩm khác và là nguồn cung cấp calo chính trong sữa, chất bổ sung dinh dưỡng cần thiết cho trẻ sơ sinh. Theo số liệu thống kê, tỷ lệ kém hấp thu lactose ở Việt Nam là 86,8%, cao hơn so với Trung Quốc (81%), Ấn Độ (80,79%) và thấp hơn Singapore (93%) [5]. Chính vì vậy, vi khuẩn lactic phân lập từ nguồn sữa bò sẽ có tiềm năng ứng dụng trong chế phẩm probiotic, khả năng sinh β -galactosidase có thể thủy phân đường lactose.

Sữa là thực phẩm chứa hàm lượng chất dinh dưỡng cao, là môi trường lý tưởng cho sự phát triển của nhiều loài vi sinh vật, làm giảm chất lượng sữa, ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe con người. Theo FAO [6], sữa nhiễm khuẩn có thể gây ra vấn đề lớn cho sức khỏe cộng đồng và là nguyên nhân gây ngộ độc thực phẩm. Nhóm vi khuẩn gây bệnh có thể nhiễm vào sữa như: *Salmonella*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*,... *Bacillus cereus* là loại vi khuẩn sinh độc tố gây nôn mửa và tiêu chảy, *E. coli* khiến sữa có mùi ôi thiu,... [7], [8].

Do đó, bài báo này khảo sát về các hoạt tính sinh học được tìm thấy ở vi khuẩn lactic phân lập từ sữa để ứng dụng trong việc sản xuất các sản phẩm từ sữa và các chế phẩm probiotic.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Nguồn phân lập: sữa bò vừa vắt được lấy ở trang trại Phù Đồng (xã Phù Đồng, Gia Lâm, ngày lấy 03/11/2023) và hộ gia đình tại Ba Vì (xã Vân Hòa, huyện Ba Vì, ngày lấy 08/10/2023).

Môi trường MRS Broth (Himedia, Ấn Độ) (g/L): Cao thịt (10 g), Cao nấm men (5 g), peptone (10 g), glucoza (20 g), CH_3COONa (5 g), K_2HPO_4 (2 g), amonicitrat (2 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g), MnSO_4 (0,04 g), Tween 80 (1 ml), agar (20 g), CaCO_3 (5 g), pH = 6,5.

Môi trường LB (Himedia, Ấn Độ) (g/L): peptone (10 g), cao nấm men (5 g), NaCl (5 g), agar (20 g), pH = 7,0.

Năm chủng vi khuẩn kiểm định: *Bacillus cereus* ATTC11778, *Escherichia coli* ATTC25922, *Listeria monocytogenes* ATTC19111, *Staphylococcus aureus* ATTC25923, *Salmonella Typhimurium* ATTC14028 (Công ty TNHH Đảm bảo Chất lượng Việt Nam – AoV cung cấp) được nuôi trong môi trường LB lỏng.

2.2. Phương pháp phân lập vi khuẩn lactic

Mẫu sữa bò vừa thu hoạch từ Ba Vì và Phù Đồng được pha loãng với nước muối sinh lý 0,85% theo hệ số 10. Tiến hành cấy đều 100 μL dung dịch ở 3 độ pha loãng cuối cùng (10^{-1} ,

10^{-2} , 10^{-3} đối với mẫu sữa từ Ba Vì và 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} đối với mẫu sữa ở Phù Đổng) lên đĩa thạch MRS Agar có bổ sung 1% CaCO_3 và nuôi ở 35 °C trong 24 - 48 giờ, sau đó chọn những khuẩn lạc có vòng phân giải CaCO_3 làm chủng giống.

2.3. Phương pháp tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic sinh β -galactosidase

Chủng vi khuẩn lactic sinh β -galactosidase được tuyển chọn bằng phương pháp nuôi cấy trên môi trường thạch MRS có bổ sung X-gal theo Vasudha và cộng sự [2].

Môi trường MRS được bổ sung 60 μl X-gal nồng độ 20 mg/ml và cấy chấm điểm, vi khuẩn đưa vào tủ nuôi cấy ở nhiệt độ 35 °C, trong điều kiện yếm khí, tiến hành kiểm tra kết quả sau 24 giờ và 48 giờ [2], [9]. Kết quả dương tính được thể hiện bằng việc quan sát thấy khuẩn lạc có màu xanh indole.

2.4. Phương pháp tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic sinh Exopolysaccharide

Sàng lọc các chủng vi khuẩn lactic có khả năng sinh tổng hợp EPS với thuốc thử anilin blue (một chất nhuộm màu có khả năng liên kết với β -(1,3)-glucan của exopolysaccharide) và môi trường MRS có bổ sung 10% sucrose và sử dụng phương pháp cấy chấm điểm [3], [4], [10]. Hút 100 μl aniline blue được pha với nước cất vô trùng ở nồng độ 1 mg/ml lên bề mặt đĩa môi trường MRS agar và canh đều. Cấy chấm điểm vi khuẩn LAB, nuôi ở nhiệt độ 35 °C, sau 24 giờ và 48 giờ quan sát các khuẩn lạc sản xuất EPS thông qua việc xuất hiện khuẩn lạc màu xanh dương [10]. Sử dụng đĩa môi trường MRS được bổ sung 10% sucrose, tiến hành cấy chấm điểm vi khuẩn LAB, nuôi ở nhiệt độ 35°C, sau 24 giờ và 48 giờ quan sát các khuẩn lạc sản xuất EPS thông qua việc xuất hiện các vết nhầy xung quanh khuẩn lạc [3], [4].

2.5. Phương pháp tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic sinh bacteriocin

Sàng lọc được 5 chủng vi khuẩn lactic và nuôi lỏng ở 35°C trong 20h và 24h, sau đó ly tâm 10000vòng/phút trong 20 phút, thu lấy dịch. Sử dụng phương pháp khuếch tán giếng thạch [11].

Chang 100 μl mẫu vi khuẩn kiểm định lên đĩa petri chứa môi trường MRS agar. Hút 30 μl dịch vi khuẩn lactic vào các giếng thạch đường kính 8 mm. Nuôi trong tủ ẩm 35 °C trong 12 giờ để kiểm tra vòng khuếch tán. Hoạt tính bacteriocin sẽ được kiểm tra bằng pepsin (enzyme có khả năng thủy phân peptide, bacteriocin có bản chất là peptide hoặc protein) [12]. Dịch vi khuẩn lactic sau khi nuôi lỏng và ly tâm thu được sẽ được ủ với pepsin nồng độ 1 mg/ml trong 3 giờ ở 35 °C. Sử dụng phương pháp khuếch tán giếng thạch để so sánh.

2.6. Các thử nghiệm test catalase, nhuộm Gram của chủng SBVV2.2

Tuyển chọn được chủng SBVV2.2 và tiến hành nhuộm Gram, quan sát hình thái tế bào trên kính hiển vi ở độ phóng đại 100X; xác định hoạt tính catalase bằng dung dịch oxy già (H_2O_2) 3% phủ lên khuẩn [13].

2.6. Phương pháp định danh bằng sinh học phân tử: giải trình tự 16S rARN

Vi khuẩn LAB được định danh dựa trên giải trình tự 16S rARN thông qua phản ứng PCR với cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') bằng kỹ thuật giải trình tự Sanger trên thiết bị ABI 3130 (ThermoFisher) [13]. Thành phần phản ứng PCR: DEPC H_2O (40 μl), PCR Buffer nồng độ 1 X (5 μl), EZ PCR Mix (Phù Sa) 1 tube, mồi xuôi 10 μM nồng độ 0,3 μM (1,5 μl), mồi ngược 10 μM nồng độ 0,3 μM (1,5 μl), DNA tách chiết (2 μl). Chu trình nhiệt: 95 °C trong 5 phút; 95 °C trong 30 giây; 55 °C trong 30 giây; 72 °C trong 1 phút 45 giây; lặp lại từ bước 2 đến 4: 35 chu kỳ; 72 °C trong 5 phút; 25 °C trong 2 phút.

Sản phẩm PCR được tinh sạch và kiểm tra trên gel agarose 2%, kết quả giải trình tự 16S rARN (Công ty Cổ phần Phù Sa Genomic) thu được dưới dạng file.ab1, lắp ráp kết quả giải trình tự của hai mồi, đối chiếu với trình tự của các loài đã được công bố bằng cách Blast nucleotide

trên NCBI và lựa chọn những loài có trình tự tương đồng cao để xác định loài. Từ kết quả đó xây dựng cây phát sinh chủng loại để xác định tên loài sử dụng phần mềm MEGA11 [14].

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Phân lập vi khuẩn lactic

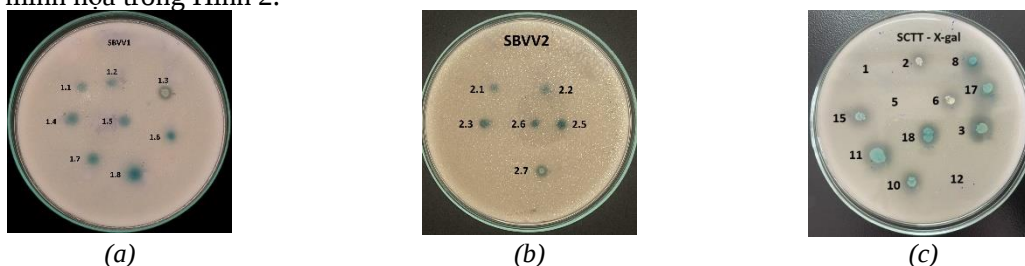
Tất cả 88 khuẩn lạc vi khuẩn lactic được phân lập từ hai mẫu sữa bò đều tạo vòng phân giải CaCO_3 được minh họa trong Hình 1. Trong đó, 20 khuẩn lạc có đường kính vòng phân giải/ đường kính khuẩn lạc $< 1,5$ (39%), 66 khuẩn lạc có $1,5 \leq$ đường kính vòng phân giải/ đường kính khuẩn lạc ≤ 2 (75%) và 2 khuẩn lạc có đường kính vòng phân giải/ đường kính khuẩn lạc > 2 (3%).



Hình 1. Khuẩn lạc phân lập: (a) mẫu sữa bò thu ở Phù Đổng có độ pha loãng 10^{-1} và (b) mẫu sữa bò thu ở Ba Vì có độ pha loãng 10^{-5}

3.2. Khảo sát hoạt tính sinh β -galactosidase

Từ 88 khuẩn lạc vi khuẩn lactic được phân lập, sàng lọc 25 chủng có vòng phân giải CaCO_3 (khuẩn lạc có đường kính vòng phân giải/ đường kính khuẩn lạc từ 1,5-2 cm), tiến hành kiểm tra khả năng sinh β -galactosidase bằng phương pháp cấy chấm điểm lên đĩa thạch có bổ sung X-gal được minh họa trong Hình 2.



Hình 2. Khả năng sinh β -galactosidase của các chủng: (a) Mẫu SBVV1; (b) Mẫu SBVV2; (c) Mẫu SCTT (SBVV1 – khuẩn lạc từ mẫu sữa Phù Đổng có độ pha loãng 10^{-1} ; SBVV2 – khuẩn lạc từ mẫu sữa Phù Đổng có độ pha loãng 10^{-2} ; SCTT – khuẩn lạc từ mẫu sữa Ba Vì có độ pha loãng 10^{-5})

Sau 48 giờ, thu được 22 chủng cho khuẩn lạc màu xanh lá, có khả năng sinh β -galactosidase. Dựa vào độ đậm nhạt màu sắc khuẩn lạc, chứng tỏ các chủng sinh β galactosidase khác nhau.

3.3. Khảo sát khả năng sinh Exopolysaccharide (EPS)

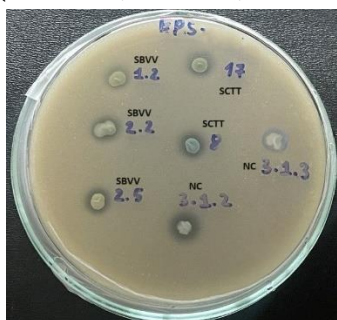
Tuyển chọn 8 chủng vi khuẩn lactic có khả năng sinh β -galactosidase (khuẩn lạc có màu xanh lá đậm, phân giải CaCO_3), tiến hành kiểm tra khả năng sinh EPS với thuốc thử anilin blue và môi trường MRS có bổ sung 10% sucrose bằng phương pháp cấy chấm điểm, kết quả được trình bày ở Bảng 1 và Hình 3.

Mức độ sinh EPS của các chủng vi khuẩn lactic là khác nhau dựa trên màu sắc khuẩn lạc, thể hiện màu xanh nhạt hay đậm hơn với thuốc thử aniline blue. Các khuẩn lạc có khả năng sinh EPS sẽ xuất hiện vệt nhót khi bổ sung sucrose 10% vào môi trường được minh họa trong Hình 4.

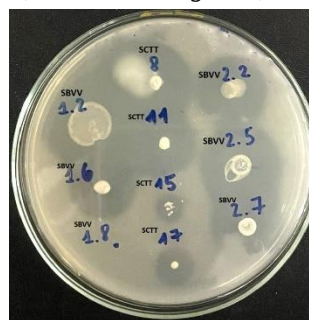
Bảng 1. Khả năng sinh Exopolysaccharide

Tên chủng	SBVV1.2	SBVV1.6	SBVV2.2	SBVV2.5	SBVV2.7	SCTT8	SCTT15	SCTT17
Biểu hiện (Anilin blue)	++	+	++	++	+	++	+	++
Biểu hiện (Sucrose 10%)	x	-	x	x	-	x	-	-

(+: Biểu hiện xanh nhạt, ++: Biểu hiện xanh đậm); (x: có vệt nhót, -: Không có vệt nhót)



Hình 3. Khả năng sinh EPS với anilin blue của các chủng: Chủng SBVV1.2; Chủng SBVV2.2; Chủng SBVV2.5; Chủng SCTT17 và Chủng SCTT8



Hình 4. Khả năng sinh EPS với Sucrose 10% của các chủng: Chủng SBVV1.2; Chủng SBVV2.2; Chủng SBVV2.5 và Chủng SCTT8

Theo Paulo và cộng sự [3], các chủng vi khuẩn lactic được phân lập từ sữa bò và sữa dê khi sử dụng đường sucrose cho kết quả dương tính cao so với glucose và lactose, sẽ xuất hiện vệt nhót hoặc chất nhầy xung quanh khuẩn lạc. Tổng số EPS do vi sinh vật tạo ra bị ảnh hưởng mạnh mẽ bởi lượng đường có trong môi trường. Tuy nhiên, có một số loại đường tốt hơn cho việc sản xuất EPS vì việc sản xuất polyme phụ thuộc vào chủng được thử nghiệm và do đó phụ thuộc vào quá trình chuyển hóa enzyme của từng chủng [15]. Tuy nhiên, theo Rühmann Broder và cộng sự [10], việc bổ sung đường sucrose vào môi trường đĩa thạch có thể tạo hiện tượng âm tính giả do phương pháp này lựa chọn chủng thông qua hình thái khuẩn lạc xảy ra theo cách diễn giải của con người và khó có thể chuẩn hóa được. Ruas-Madiedo và Reyes-Gavilán [15] cũng chỉ ra việc sử dụng từ ngữ mô tả hình thức sản xuất EPS của vi khuẩn lactic cũng dễ gây nhầm lẫn. Vì vậy, nghiên cứu này đã sử dụng thêm anilin Blue làm thuốc nhuộm để có tính chính xác cao.

Qua quá trình tuyển chọn và sàng lọc, 5 chủng vi khuẩn lactic thể hiện tốt khả năng sinh β -galactosidase và exopolysaccharide được sử dụng để tiến hành các thử nghiệm tiếp theo.

3.4. Khảo sát khả năng sinh bacteriocin của vi khuẩn lactic

Các chủng SBVV 1.2, 2.2, 2.5, và SCTT 8, 17 được nuôi lỏng ở 35 °C trong 24 giờ, sau đó được ly tâm 10000 vòng/phút trong 20 phút thu lấy dịch trong và khảo sát hoạt tính bacteriocin sử dụng phương pháp khuếch tán giếng thạch.

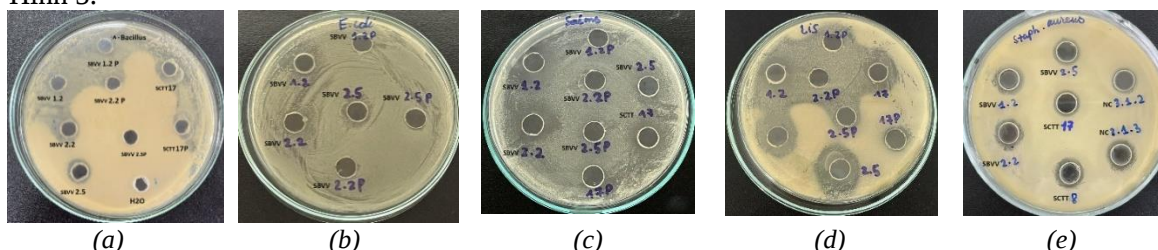
Bảng 2. Kiểm tra hoạt tính bacteriocin

Chủng chỉ thị	Chủng lactic	Dịch không có pepsin D ₁ (mm)	Dịch bổ sung pepsin D ₂ (mm)	D ₁ - D ₂ (mm)
<i>B. cereus</i> ATTC11778	SBVV1.2	7,0	-	7,0
	SBVV2.2	7,2	-	7,2
	SBVV2.5	4,0	-	4,0
	SCTT8	6,4	-	6,4
	SCTT17	5,6	-	5,6
<i>E. coli</i> ATTC25922	SBVV1.2	6,4	-	6,4
	SBVV2.2	10,0	-	10,0

<i>S. Typhimurium</i> ATTC14028	SBVV2.5	8,0	-	8,0
	SCTT8	6,4	-	6,4
	SCTT17	6,4	-	6,4
	SBVV1.2	12,0	-	12,0
	SBVV2.2	12,0	-	12,0
	SBVV2.5	4,0	-	4,0
	SCTT8	8,0	-	8,0
<i>L. monocytogenes</i> ATTC19111	SCTT17	6,4	-	6,4
	SBVV1.2	10,0	-	10,0
	SBVV2.2	8,8	-	8,8
	SBVV2.5	6,4	1,6	4,8
	SCTT8	16,8	1,6	15,2
<i>S. aureus</i> ATTC25923	SCTT17	6,4	1,6	4,8
	SBVV1.2	4,0	x	x
	SBVV2.2	4,0	x	x
	SBVV2.5	2,4	x	x
	SCTT8	3,2	x	x
	SCTT17	1,6	x	x

(-) – Không có vòng kháng; x – Chưa tiến hành thí nghiệm

Từ kết quả trong Bảng 2, 5 chủng được tuyển chọn có khả năng kháng 5 loại vi khuẩn gây bệnh (*Bacillus cereus* ATTC11778, *Escherichia coli* ATTC25922, *Listeria monocytogenes* ATTC19111, *Staphylococcus aureus* ATTC25923, *Salmonella Typhimurium* ATTC14028). Trong đó, chủng SBVV2.2 có khả năng kháng khuẩn tốt hơn 4 chủng còn lại với vòng kháng khuẩn có đường kính lớn hơn và khả năng kháng chủ yếu do bacteriocin được minh họa trong Hình 5.



Hình 5. Khả năng sinh bacteriocin của chủng SBVV2.2: (a) Vi khuẩn chỉ thị *B. cereus* ATTC11778; (b) Vi khuẩn chỉ thị *E. coli* ATTC25922; (c) Vi khuẩn chỉ thị *S. Typhimurium* ATTC14028; (d) Vi khuẩn chỉ thị *L. monocytogenes* ATTC19111 và (e) Vi khuẩn chỉ thị *S. aureus* ATTC25923; Ký hiệu P: có bổ sung pepsin

Từ kết quả ở Hình 5, chủng SBVV2.2 có khả năng tạo bacteriocin tốt nhất, kích thước vòng kháng đối với *B. cereus* ATTC11778 là 7,2 mm; *S. aureus* ATTC25923 là 4 mm; *E. coli* ATTC25922 là 10 mm; *S. typhimurium* ATTC14028 là 12 mm; *L. monocytogenes* ATTC19111 là 8,8 mm.

Theo Suskovic và cộng sự [8], các chủng vi khuẩn lactic có khả năng kháng khuẩn do một số yếu tố khác như axit hữu cơ, hydrogen peroxide, carbon dioxide,... Tiến hành kiểm tra hoạt tính bacteriocin bằng pepsin, ly tâm thu dịch, dịch được bổ sung pepsin và được ủ trong 12 giờ. Mẫu được bổ sung pepsin không có khả năng kháng khuẩn hoặc vòng kháng khuẩn nhỏ hơn.

Theo Mikkili và cộng sự [7], bacteriocin thu được từ vi khuẩn lactic phân lập từ nguồn sữa bò ở một nông trại tại Hyderabad, Ấn Độ sau khi được tinh sạch có khả năng kháng vi khuẩn *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* với đường kính lần lượt là 8 mm, 21 mm, 11 mm. Các chủng vi khuẩn *L. plantarum* được phân lập từ sữa lên men có vòng kháng vi khuẩn *E. coli* MTCC433 dao động từ 4,66–23,66 mm, *S. aureus* ATCC6538 từ 7,66–12,66 mm, *L. monocytogenes* MTCC1143 từ 9,00–18,66 mm [2]. Theo Elsaadany và cộng sự [16], chủng *L. plantarum* được phân lập từ sữa lạc đà vừa thu hoạch chỉ có khả năng kháng *B. cereus* ATCC10987 từ 15–22 mm. Theo nghiên cứu của Hu và cộng sự [17], các chủng *L. plantarum* phân lập từ các sản phẩm sữa lên men có khả năng kháng mạnh đối với vi khuẩn *E. coli* ATCC35128 từ 6–11 mm, vi khuẩn *S.*

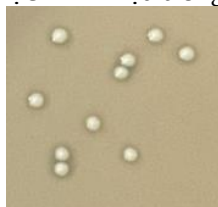
aureas ATCC12600 từ 8–12 mm và kháng yếu đối với vi khuẩn *S. typhimurium* ASI.1174 từ 2–6 mm. Trong nghiên cứu này, chủng SBVV2.2 có khả năng kháng cả 5 chủng vi khuẩn kiểm định và kháng mạnh với *S. typhimurium* ATTC14028, *B. cereus* ATTC11778, *L. monocytogenes* ATTC19111, *E. coli* ATTC25922.

Như vậy, chủng SBVV2.2 có tiềm năng sinh học cao được tiến hành kiểm tra đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào, định danh sinh học phân tử.

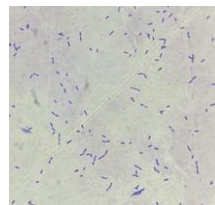
3.5. Các thử nghiệm test catalase, nhuộm Gram của chủng SBVV2.2

Chủng vi khuẩn SBVV2.2 được xác định các đặc điểm sinh lý và sinh hóa theo mô tả của Kandler và Weiss [18]. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng SBVV2.2 được quan sát trên đĩa thạch sau nuôi cấy 48 giờ, ở 35 °C và soi trên kính hiển vi ở độ phóng đại 100x. Khuẩn lạc có kích thước nhỏ, tròn, màu trắng sữa, vòng phân giải trung bình được minh họa trong Hình 6(a).

Vi khuẩn LAB là vi khuẩn Gram (+), trực khuẩn hình que, không tạo bào tử, không di động, catalase (-) được minh họa trong Hình 6(b).



(a)



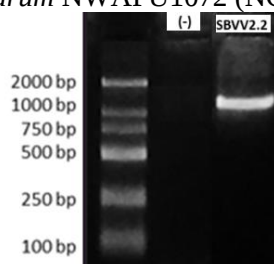
(b)

Hình 6. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của chủng SBVV2.2:

(a) Hình dạng khuẩn lạc và (b) Hình dạng tế bào (100x)

3.6. Định tên bằng sinh học phân tử: giải trình tự 16sARN

DNA tổng số của chủng SBVV2.2 được tách chiết và đoạn gen mã hóa cho 16S rARN được khuếch đại nhờ phản ứng PCR sử dụng cặp mồi 27F/1492R, được điện di trên gel agarose 2% thu được 1 băng có kích thước khoảng 1,4 kb (Hình 7). Sản phẩm PCR đoạn gen 16S rARN của chủng SBVV2.2 được tinh sạch, giải trình tự cho thấy đoạn gen dài 1421 bp và trình tự này được so sánh với các trình tự 16S rARN của vi khuẩn lactic trên GenBank với phần mềm Blastn (Hình 8). Kết quả Blastn cho thấy đoạn gen 16S rARN của chủng SBVV2.2 có độ tương đồng đến 100% với chủng *Lactobacillus plantarum* NWAUFU1072 (NCBI: MG461963.1).

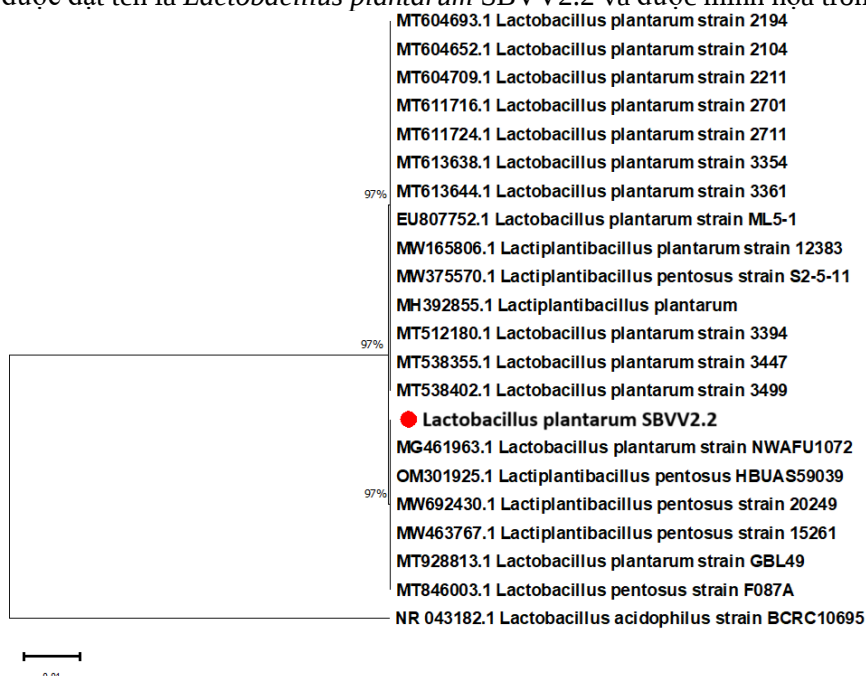


Hình 7. Kết quả điện di sản phẩm sau PCR của chủng SBVV2.2

Sequences producing significant alignments		Download	Select columns	Show	100				
☒ select all	100 sequences selected	GenBank	Graphics	Distance tree of results	MSA Viewer				
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Lactobacillus plantarum strain NWAUFU1072 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus plantarum	2610	2610	99%	0.0	100.00%	1420	MG461963.1
☒	Lactobacillus pentosus strain HBUAS59039 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus pentosus	2610	2610	99%	0.0	100.00%	1492	OM301925.1
☒	Lactobacillus pentosus strain 20249 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus pentosus	2610	2610	99%	0.0	100.00%	1436	MW692430.1
☒	Lactobacillus pentosus strain 15261 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus pentosus	2610	2610	99%	0.0	100.00%	1435	MW463767.1
☒	Lactobacillus plantarum strain GBL49 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus plantarum	2610	2610	99%	0.0	100.00%	1455	MT328813.1

Hình 8. Kết quả Blastn trình tự chủng SBVV2.2

Cây phát sinh loài được xây dựng bằng phần mềm MEGA11, chủng SBVV2.2 nằm gần các chủng *Lactobacillus plantarum* khác (MT538402.1, MT538355.1, MT512180.1, v.v.), có mức độ tương đồng cao với các chủng liên kề, được khẳng định bởi giá trị bootstrap 97% (độ tin cậy cao). Chủng được đặt tên là *Lactobacillus plantarum* SBVV2.2 và được minh họa trong Hình 9.



Hình 9. Cây phát sinh loài *Lactobacillus plantarum* SBVV2.2

4. Kết luận

Từ 2 mẫu sữa, chủng SBVV2.2 đã phân lập và tuyển chọn thể hiện đầy đủ các hoạt tính sinh học: β -galactosidases, exopolysaccharise, và khả năng sinh bacteriocin kháng cả 5 chủng vi khuẩn kiểm định: *B. cereus* ATTC11778, *E. coli* ATTC25922, *S. typhimurium* ATTC14028, *L. monocytogenes* ATTC19111, *S. aureus* ATTC25923. Chủng SBVV2.2 catalase âm tính, Gram (+). Định tên theo phương pháp sinh học phân tử 16S rARN chủng SBVV2.2 có độ tương đồng 100% với chủng *Lactobacillus plantarum* NWAUFU1072 và được đặt tên là *Lactobacillus plantarum* SBVV2.2.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] C. Liu, W.-J. Xue, H. Ding, C. An, S.-J. Ma, and Y. Liu, "Probiotic Potential of *Lactobacillus* Strains Isolated from Fermented Vegetables in Shaanxi, China," *Front Microbiol.*, vol. 12, 2022, Art. no. 774903.
- [2] M. Vasudha, C. S. Prashantkumar, M. Bellurkar, V. Kaveeshwar, and D. Gayathri, "Probiotic potential of β -galactosidase-producing lactic acid bacteria from fermented milk and their molecular characterization," *Biomed Rep*, vol. 18, no. 3, 2023, Art. no. 23.
- [3] E. M. Paulo, M. P. Vasconcelos, I. S. Oliveira, H. M. de J. Affe, R. Nascimento, I. S. de Melo, M. R. de A. Roque, and S. A. de Assis, "An alternative method for screening lactic acid bacteria for the production of exopolysaccharides with rapid confirmation," *Food Science and Technology*, vol. 32, no. 4, pp. 710-714, 2012.
- [4] R. Xu, S. Ma, Y. Wang, L. Liu, and P. Li, "Screening, identification and statistic optimization of a novel exopolysaccharide producing *Lactobacillus paracasei* HCT," *African Journal of Microbiology Research*, vol. 4, no. 9, pp. 783-795, 2010.
- [5] H. V. Dao, P. T. Tran, R. Hall, and L. V. Dao, "Initial evaluation of lactose malabsorption in Vietnamese people," *Journal of 108-clinical Medicine and Pharmacy*, vol. 13, no. 7, pp. 57-62, 2018.

- [6] T. D. Trinh and N. T. Nguyen, "Evaluation on quality and bacterial infection level of fresh milk in Ba Vi district, Ha Noi City," *Veterinary Medicine - VNUA. Veterinary Sciences and Technology*, vol. 24, no. 1, pp. 52-58, 2017.
- [7] I. Mikkili, N. R. Sankar, V. D. Priyanka, P. S. Reddy, P. Rajanikanth, and V. Kiran Kumar, "Purification and Characterization of Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* Isolated from Cow Milk," *International Journal of Microbiological Research*, vol. 3, no. 2, pp. 133-137, 2012.
- [8] J. Sukovic, B. Kos, J. Beganovic, L. A. Pavunc, K. Habianic, and S. Matosic, "Antimicrobial Activity The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria," *Food Technology and Biotechnology*, vol. 48, no. 3, pp. 296-307, 2010.
- [9] E. Selvarajan and V. Mohanasrinivasan, "Kinetic studies on exploring lactose hydrolysis potential of β galactosidase extracted from *Lactobacillus plantarum* HF571129," *Journal of Food Science and Technology*, vol. 52, no. 10, pp. 6206-6217, 2015.
- [10] B. Rühmann, J. Schmid, and V. Sieber, "Methods to identify the unexplored diversity of microbial exopolysaccharides," In *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Research Foundation, vol. 6, 2015, Art. no. 565.
- [11] M. S. M. Vesković, D. A. Dukić, and N. R. Memiši, "Bacteriocins produced by lactic acid bacteria - A review," In *Acta Periodica Technologica*. University of Novi Sad, Faculty of Technology, vol. 45, pp. 271-283, 2014.
- [12] D. L. T. Nguyen, V. T. Hoang, T. T. T. Nguyen, and A. H. Nguyen, "Isolation and selection of lactic acid bacteria from Vietnamese fermented pork meat product with antimicrobial activity and characterization of bacteriocin," *Vietnam J. Agri. Sci.*, vol. 14, no. 7, pp. 1089-1099, 2016.
- [13] D. F. Wasan, S. S. Z. Alabden, and A. A. Tawfeeq, "Molecular Investigation of *Lactobacillus plantarum* isolated from Raw cow milk in Kirkuk/Iraq," *Volatiles & Essent. Oils*, vol. 8, no. 5, pp. 9162-9172, 2021.
- [14] K. Tamura, G. Stecher, and S. Kumar, "MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 38, no. 7, pp. 3022-3027, 2021.
- [15] P. Ruas-Madiedo and G. C. de L. Reyes-Gavilán, "Invited review: Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria," *Journal of Dairy Science, American Dairy Science Association*, vol. 88, no. 3, pp. 843-856, 2005.
- [16] K. Elsaadany, E. Kheadr, S. Elmesseiry, S. Hamdy, and N. Dabour, "Molecular Screening of Functional Lactic Acid Bacteria with Potential Production of Antimicrobial Peptides from Milk Proteins for Application as Preservative Dairy Starter," *Journal of Food Biochemistry*, vol. 1, 2024, Art. no. 7634462.
- [17] C. H. Hu, L. Q. Ren, Z. Ying, and B. C. Ye, "Characterization of antimicrobial activity of three *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese traditional dairy food," *Food Science and Nutrition*, vol. 7, no. 6, pp. 1997-2005, 2019.
- [18] O. Kandler and N. Weiss, "Regular, Non-Sporing Gram-Positive Rods. In: Sneath, H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G., Eds.," *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 1208-1234, 1986.