

ISOLATION AND SELECTION OF FRUCTOPHILIC LACTIC BACTERIA FROM BEESWAX THAT ARE ABLE TO TOLERATE SIMULATED INTESTINAL ENVIRONMENT

Tran Vu Phuong, Huynh Ngoc Thanh Tam, Huynh Thi Nhu Y
Ca Thuy Linh, Nguyen Hung Thinh, Huynh Yen Nhi*

Institute of Food and Biotechnology - Can Tho University

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 13/01/2025	This study isolated 22 strains of fructophilic lactic acid bacteria from three beeswax samples collected in Can Tho city, Dak Lak province, and An Giang province. The research results showed that 15 strains exhibited good viability in low pH environments, with individual strain survival rates ranging from 39% to 97.5%. These strains were able to tolerate medium supplemented with 0.3% bile salts. Among these, 9 strains showed the highest survival rates in all three simulated gastrointestinal environments, with individual survival rates all exceeding 80%. Notably, the bacterial strain AG11 emerged as a highly promising strain, achieving survival rates above 90% at both pH 2 and pH 3. It demonstrated tolerance to bile salts and simulated oral cavity, stomach, and small intestine environments, with respective survival rates of 96.4, 98.9, 95, and 79.1%. Results from 16S rRNA gene sequencing identified strain AG11 as <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> / <i>Lactiplantibacillus pentosus</i> with 99.45% similarity. Based on these findings, the <i>Lactiplantibacillus</i> strain AG11 shows significant potential as a fructophilic lactic acid bacteria for future application in the production of probiotic products.
Revised: 01/7/2025	
Published: 01/7/2025	
KEYWORDS	
Beeswax	
Bile salt	
Fructophilic lactic acid bacteria	
Low pH	
Probiotic	

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CHỦNG VI KHUẨN ACID LACTIC ƯA FRUCTOSE TỪ SÁP ONG CÓ KHẢ NĂNG CHỊU ĐƯỢC MÔI TRƯỜNG ĐƯỜNG RUỘT MÔ PHỎNG

Trần Vũ Phương, Huỳnh Ngọc Thanh Tâm, Huỳnh Thị Như Ý
Ca Thúy Linh, Nguyễn Hưng Thịnh, Huỳnh Yên Nhi

Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm - Đại học Cần Thơ

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 13/01/2025	Nghiên cứu đã phân lập được 22 chủng vi khuẩn acid lactic ưa fructose từ ba mẫu sáp ong tại thành phố Cần Thơ, tỉnh Đắk Lắk và tỉnh An Giang. Kết quả nghiên cứu cho thấy 15 chủng phân lập có khả năng sống tốt trong môi trường pH thấp với tỷ lệ sống sót của từng chủng dao động từ 39% đến 97,5%. Các chủng vi khuẩn này có khả năng chịu được môi trường bổ sung 0,3% muối mật. Trong đó, 9 chủng có tỷ lệ sống sót cao nhất tại cả ba loại môi trường đường ruột mô phỏng, với tỷ lệ sống sót của từng chủng đều trên 80%. Đặc biệt, chủng vi khuẩn AG11 là chủng có nhiều tiềm năng khi đạt tỷ lệ sống sót ở pH từ 2 đến 3 đều trên 90%, với khả năng chịu được muối mật, môi trường khoang miệng, dạ dày và ruột non với tỷ lệ sống sót đạt lần lượt là 96,4; 98,9; 95 và 79,1%. Kết quả giải trình tự đoạn gen 16S rRNA cho thấy chủng vi khuẩn AG11 là chủng <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> và <i>Lactiplantibacillus pentosus</i> với độ tương đồng là 99,45%. Với kết quả nghiên cứu này, chủng vi khuẩn <i>Lactiplantibacillus</i> AG11 là chủng vi khuẩn ưa fructose tiềm năng trong ứng dụng sản xuất các sản phẩm probiotic trong tương lai.
Ngày hoàn thiện: 01/7/2025	
Ngày đăng: 01/7/2025	
TỪ KHÓA	
Sáp ong	
Muối mật	
Vi khuẩn acid lactic ưa fructose	
pH thấp	
Probiotic	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.11872>

* Corresponding author. Email: hynhi@ctu.edu.vn; nhihuynh221299@gmail.com

1. Giới thiệu

Probiotic là các vi sinh vật sống mà khi được bổ sung một lượng vừa đủ sẽ mang lại lợi ích sức khỏe cho vật chủ. Các sản phẩm probiotic hiện nay không chỉ mang lại lợi ích sức khỏe cho con người mà còn mang lại nhiều lợi ích sức khỏe cho cả vật nuôi. Hầu hết các chủng vi khuẩn acid lactic (LAB – lactic acid bacteria) thường được sử dụng làm chế phẩm sinh học trong thực phẩm [1]. Các loại men vi sinh phổ biến nhất trong các sản phẩm probiotic bao gồm *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp. và *Saccharomyces boulardii*,... Những vi sinh vật này có liên quan đến một số tác dụng có lợi, chủ yếu liên quan đến sức khỏe đường tiêu hóa [2] và hệ thống miễn dịch [3] cũng như hỗ trợ điều trị bệnh tiểu đường [4], béo phì [5], tăng cholesterol máu [6], hỗ trợ điều trị ung thư [7]. Trái cây, rau và đặc biệt là mật ong đã được công bố chứa nhiều LAB với nhiều đặc tính lợi khuẩn chưa được khám phá để ứng dụng vào các sản phẩm lên men tốt cho sức khỏe người tiêu dùng. Tuy nhiên, mỗi loài trái cây, rau và mật ong sẽ chứa một cộng đồng vi sinh vật nhất định, mang tính đặc trưng thuộc hệ LAB.

Trong nhóm LAB, vi khuẩn acid lactic ưa fructose (FLAB- fructophilic lactic acid bacteria) là LAB tiềm năng mới đã được khám phá và được chứng minh là có nhiều chức năng sinh học độc đáo [8], [9]. FLAB là nhóm duy nhất trong LAB vì chúng ưu tiên sử dụng đường D - fructose hơn D - glucose làm nguồn carbon. Những vi khuẩn này chủ yếu được phân lập từ các nguồn giàu fructose bao gồm hoa, trái cây, các sản phẩm lên men từ hoa và trái cây, thực phẩm chứa nhiều fructose như mật ong hay từ ruột của ong mật [10], [11]. Cho đến nay, việc phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn FLAB vẫn còn rất ít vì FLAB là một nhóm mới được phát hiện nên các đặc điểm độc đáo của chúng chưa được nghiên cứu sâu. Bên cạnh đó, FLAB chưa được mô tả hay nghiên cứu sâu về các chức năng sinh học và đặc biệt là chức năng probiotic của chúng. Để tuyển chọn được các chủng FLAB có tiềm năng probiotic thì các chủng vi khuẩn này phải có khả năng chịu được pH thấp của dạ dày, chịu được hàm lượng muối mật và đặc biệt khi bổ sung hệ khuẩn này vào có thể chúng có khả năng thích nghi tốt với môi trường tiêu hóa thức ăn khi có mặt một số enzyme tiêu hóa cũng như các thành phần hỗ trợ tiêu hóa thức ăn khác. Do đó, việc phân lập các chủng FLAB là hướng đi hoàn toàn mới nhằm đa dạng hóa nguồn giống chủng có tiềm năng probiotic trong tương lai.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Phân lập các chủng FLAB

Mẫu sáp ong mật khi thu sẽ được chuyển vào túi nhựa đã được khử trùng bề mặt. Sau đó, nghiền nát và đông hóa mẫu bằng máy dập mẫu. Tiến hành tăng sinh mẫu trên môi trường lỏng FYP bao gồm 20 g/L D - fructose; 10 g/L cao chiết nấm men; 5 g/L peptone; 2 g/L CH₃COONa; 0,5 g/L Tween 80; 0,2 g/L MgSO₄ · 7H₂O; 0,01 g/L MnSO₄ · 4H₂O; 0,01 g/L FeSO₄ · 7H₂O; 0,05 g/L cycloheximide và 0,05g NaN₃ [12] trên máy lắc với tốc độ 150 vòng/phút trong 24 giờ ở nhiệt độ 37°C. Huyền phù vi khuẩn sau khi tăng sinh sẽ được pha loãng 1.000 lần với nước cất vô trùng để tiến hành phân lập. 100 µL huyền phù vi khuẩn sau khi pha loãng sẽ được trải trên môi trường FYP agar có bổ sung 5 g/L CaCO₃ và ủ ở nhiệt độ phòng. Sau 24 - 48 giờ, các chủng LAB sẽ được quan sát và nhận diện sơ bộ về các đặc điểm đặc trưng như khuẩn lạc có dạng hình tròn, màu trắng đục hoặc trắng sữa, độ nổi mô, bìa nguyên; tế bào vi khuẩn có dạng hình que, hình cầu, hình cầu đôi hoặc chuỗi cầu; LAB là các chủng vi khuẩn Gram dương, âm tính với các thử nghiệm catalase, oxidase, indole và có khả năng phân giải CaCO₃. Sau đó, các chủng LAB sẽ được cấy phân lập nhiều lần sang môi trường FYP agar để nhận được khuẩn lạc ròng. Để phân biệt giữa LAB và FLAB cần tiến hành tăng sinh đồng thời từng chủng vi khuẩn phân lập vào môi trường lỏng FYP và GYP (thành phần môi trường giống với môi trường FYP, tuy nhiên thay thế 20 g/L D - fructose thành D - glucose) để so sánh sự phát triển của các chủng vi khuẩn trên hai loại môi trường. Mật số vi khuẩn được xác định bằng phương pháp đo độ đục huyền phù vi khuẩn ở OD_{620nm}:

$$\Delta OD = OD_{\text{sau 24 giờ}} - OD_{\text{ban đầu}} \quad (1)$$

Chủng vi khuẩn được xác định và tuyển là FLAB khi khả năng phát triển trên môi trường FYB tốt hơn môi trường GYP, được tiếp tục thử nghiệm khả năng sống sót trong môi trường: pH thấp, muối mật và mô phỏng đường ruột.

2.2. Khảo sát khả năng sống sót của các chủng FLAB trong môi trường: pH thấp, muối mật, nước bọt nhân tạo, dịch vị nhân tạo và dịch ruột nhân tạo

Các chủng FLAB tuyển chọn ở mục 2.1 được nuôi tăng sinh trong môi trường lỏng FYP trên máy lắc với tốc độ 150 vòng/phút ở nhiệt độ 37 °C trong 48 giờ (điều chỉnh mật số vi khuẩn 10^8 CFU/mL). Tiến hành ly tâm 2 mL huyền phù vi khuẩn với tốc độ 5.000 vòng/phút trong 15 phút để thu nhận sinh khối tế bào vi khuẩn, tiến hành rửa sinh khối tế bào vi khuẩn bằng nước cất vô trùng và pha về thể tích ban đầu. Chuyển 1 mL dịch vi khuẩn lần lượt vào 9 mL môi trường FYP broth đã điều chỉnh pH 1,5; 2,0; 2,5 và 3,0 vào 9 mL môi trường FYP broth có bổ sung 0,3% muối mật, mẫu vi khuẩn được ủ trong 24 giờ ở 37 °C. Bên cạnh đó, chuyển 1 mL huyền phù vi khuẩn lần lượt vào 9 mL môi trường nước bọt nhân tạo (Artificial saliva juice - ASJ) trong 5 phút ở 37 °C; vào 9 mL môi trường dịch vị nhân tạo (Simulated gastric juice – SGJ) và 9 mL môi trường dịch ruột nhân tạo (Simulated intertestinal juice – SIJ) trong 2 giờ ở 37 °C. Thành phần các loại môi trường được mô tả theo nghiên cứu của Abdelazez và cộng sự [13] (Bảng 1).

Bảng 1. Thành phần môi trường đường ruột mô phỏng

Nước bọt nhân tạo (ASJ)		Dịch vị nhân tạo (SGJ)		Dịch ruột nhân tạo (SIJ)	
Thành phần	Khối lượng	Thành phần	Khối lượng	Thành phần	Khối lượng
NaCl	6,2 g/L	NaCl	3,0 g/L	NaCl	5,0 g/L
KCl	2,2 g/L	KCl	1,1 g/L	KCl	0,6 g/L
CaCl ₂	0,22 g/L	CaCl ₂	0,15 g/L	CaCl ₂	0,3 g/L
NaHCO ₃	1,2 g/L	NaHCO ₃	0,6 g/L	NaHCO ₃	0,6 g/L
<i>Khử trùng 121 °C, làm nguội ở 20 °C và bổ sung:</i>					
α - amylase	3,0 g/L	Pepsin	3,0 g/L	Muối mật	3,0 g/L
				Precreatin	1,0 g/L
				Pepsin	3,0 g/L
pH 6,9 - 7,0		Điều chỉnh pH theo kết quả nghiên cứu tại mục 2.2		pH 7,0 - 7,6	

Cuối cùng, tiến hành đếm mật số bằng phương pháp đếm khuẩn lạc.

Tỷ lệ sống sót (%) của các chủng FLAB được xác định theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ sống sót (\%)} = ((\log \text{CFU/mL})_{\text{sau}} / (\log \text{CFU/mL})_{\text{ban đầu}}) \times 100\%$$

Chủng vi khuẩn FLAB có tiềm năng cao sẽ được tuyển chọn để tiến hành định danh.

2.3. Định danh chủng FLAB có tiềm năng

Các chủng vi khuẩn sau khi được tách rỗng sẽ tiến hành lắc ủ với 1 mL lysis buffer ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Sau đó, tiến hành ly tâm 13.000 vòng/phút trong 5 phút để thu phần dịch nổi phía trên chuyển sang ống mới, chuyển một lượng tương đương ethanol 95%, tiếp tục ly tâm 13.000 vòng/phút trong 5 phút để loại bỏ phần dịch nổi, tiến hành rửa kết tủa bằng ethanol 70%, thu sinh khối vi khuẩn bằng cách ly tâm tiếp tục 13.000 vòng/phút trong 5 phút, sấy khô mẫu trong chân không trong 10 phút (45 °C), hòa tan mẫu trong 100 μ L TE 0,1X, trữ tại -20 °C.

Thành phần của phản ứng PCR bao gồm: 3,0 μ L mạch khuôn DNA; 0,5 μ L enzyme Taq polymecrase, đoạn mồi 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACT-3') và 27F (3'-AGAGTTTGTATCCTGGCTC-5') [14]; 3,2 μ L dNTPs và 1,6 μ L MgCl₂. Sản phẩm PCR của từng chủng vi khuẩn được điện di trên gel agarose 1% bằng máy điện di ngang chứa dung dịch đệm TAE 1X (10 mM Tris-HCl (pH 8, 0,0), 0,1 mM EDTA) ở 100 V trong 30 phút. Tiến hành phân tích trình tự gene bằng kỹ thuật BLAST trên hệ thống NCBI để so sánh với các trình tự tương đồng đã được công bố, sau đó tiến hành lập sơ đồ phả hệ bằng phần mềm MEGA 12. Sau khi xác định được tên chủng vi khuẩn bằng kỹ thuật sinh học phân tử sẽ tiến hành đối chiếu với

một số thử nghiệm sinh hóa đã thực hiện ở nội dung 2.1 để xác định chính xác hơn chủng vi khuẩn phân lập.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Các chủng FLAB phân lập từ mẫu sáp ong

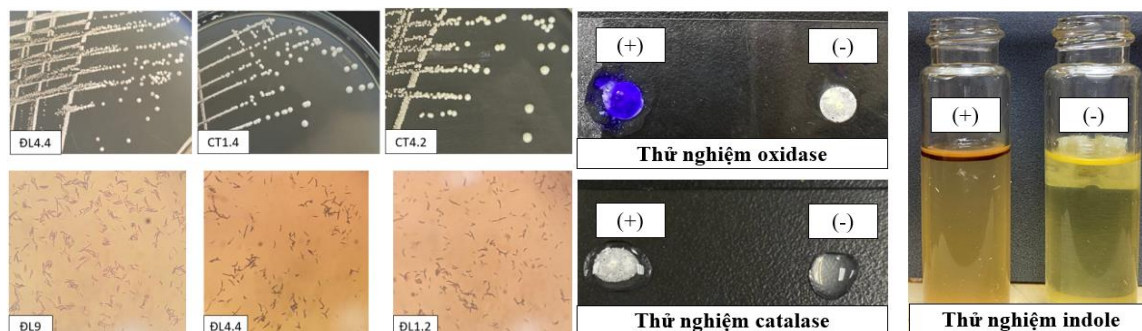
Từ các mẫu sáp ong đã phân lập được 30 chủng vi khuẩn trên môi trường FYP agar, trong đó có 22 chủng thuộc nhóm FLAB do có khả năng sử dụng đường fructose trong môi trường FYP phát triển tốt hơn khi sử dụng đường glucose trong môi trường GYP và 8 chủng có khả năng sử dụng đường glucose tốt hơn fructose (Bảng 2).

Bảng 2. Khả năng phát triển trong môi trường FYP và GYP của các chủng FLAB phân lập

STT	Chủng vi khuẩn	FYP (broth)	GYP (broth)	FYP - GYP
		$\Delta OD = \Delta OD_{24\text{ giờ}} - \Delta OD_{0\text{ giờ}}$	$\Delta OD = \Delta OD_{24\text{ giờ}} - \Delta OD_{0\text{ giờ}}$	
1	CT1.3	$1,292 \pm 0,007$	$0,832 \pm 0,019$	0,460
2	CT1.6	$0,795 \pm 0,015$	$1,014 \pm 0,056$	-0,219
3	CT2	$1,025 \pm 1,058$	$0,949 \pm 0,031$	0,076
4	CT3	$0,892 \pm 0,003$	$1,085 \pm 0,005$	-0,193
5	CT1.4	$0,928 \pm 0,479$	$0,827 \pm 0,005$	0,101
6	CT4.2	$1,072 \pm 0,004$	$0,614 \pm 0,011$	0,458
7	CT4.3	$0,744 \pm 0,007$	$1,212 \pm 0,013$	-0,468
8	CT8.1	$0,603 \pm 0,008$	$0,721 \pm 0,006$	-0,118
9	CT8.2	$0,909 \pm 0,004$	$0,161 \pm 0,579$	0,748
10	ĐL15	$1,400 \pm 0,024$	$0,955 \pm 0,490$	0,445
11	ĐL1.3	$1,298 \pm 0,005$	$0,925 \pm 0,006$	0,373
12	ĐL4	$1,222 \pm 0,112$	$1,071 \pm 0,009$	0,151
13	ĐL1.5	$0,886 \pm 0,033$	$1,088 \pm 0,006$	-0,202
14	ĐL4.4	$1,078 \pm 0,007$	$0,434 \pm 0,013$	0,644
15	ĐL4.5	$1,328 \pm 0,009$	$0,695 \pm 0,011$	0,633
16	ĐL5.2	$1,202 \pm 0,001$	$1,137 \pm 0,001$	0,065
17	ĐL8	$1,261 \pm 0,006$	$0,379 \pm 0,004$	0,882
18	ĐL8.3	$0,969 \pm 0,001$	$0,932 \pm 0,005$	0,037
19	ĐL8.4	$0,841 \pm 0,001$	$0,683 \pm 0,001$	0,158
20	ĐL8.5	$1,063 \pm 0,001$	$0,738 \pm 0,023$	0,325
21	ĐL9	$1,355 \pm 0,001$	$1,341 \pm 0,003$	0,014
22	ĐL10	$0,704 \pm 0,002$	$0,707 \pm 0,002$	-0,003
23	AG1.1	$0,703 \pm 0,001$	$0,627 \pm 0,002$	0,076
24	AG1.2	$0,777 \pm 0,006$	$0,732 \pm 0,006$	0,045
25	AG1.4	$1,222 \pm 0,001$	$1,071 \pm 0,003$	0,151
26	AG3	$0,267 \pm 0,006$	$0,382 \pm 0,001$	-0,115
27	AG4	$0,425 \pm 0,004$	$0,110 \pm 0,007$	0,315
28	AG7	$0,108 \pm 0,003$	$0,251 \pm 0,003$	-0,143
29	AG11	$0,516 \pm 0,001$	$0,044 \pm 0,001$	0,472
30	AG12	$0,561 \pm 0,003$	$0,299 \pm 0,003$	0,262

Ghi chú: Ký hiệu "CT" là mẫu được thu tại thành phố Cần Thơ; ký hiệu "ĐL" là mẫu được thu tại tỉnh Đắk Lắk và ký hiệu "AG" là mẫu được thu tại tỉnh An Giang.

Khuẩn lạc các chủng FLAB có màu trắng đục (13/22) hoặc trắng sữa (9/22); dạng hình tròn (22/22); độ nổi mô (13/22) hoặc lồi (9/22); có dạng bìa nguyên (22/22); kích thước dao động từ 0,2 đến 2,2 mm; tất cả các chủng phân lập đều có dạng hình que, Gram dương, có khả năng phân giải CaCO_3 , âm tính với thử nghiệm catalase, oxidase và indole (Hình 1 và Bảng 3).



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc, tế bào vi khuẩn và thử nghiệm sinh hóa của các chủng vi khuẩn fructophilic lactic acid

Ghi chú: (+): dương tính; (-): âm tính, thử nghiệm oxidase và catalase sử dụng *Bacillus* spp. làm đối chứng dương; thử nghiệm indole sử dụng *Escherichia coli* làm đối chứng dương.

Bảng 3. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào vi khuẩn FLAB

STT	Chủng vi khuẩn	Màu sắc	Đặc điểm hình thái				
			Hình dạng		Độ nổi	Dạng bìa	Kích thước (mm)
			Khuẩn lạc	Tế bào			
1	CT4.3	Trắng đục	Tròn	Que ngắn	Mô	Nguyên	1,0 – 1,5
2	CT1.4	Trắng sữa	Tròn	Que dài	Mô	Nguyên	1,2 – 1,7
3	CT 2	Trắng đục	Tròn	Que ngắn	Mô	Nguyên	1,1 – 1,6
4	CT1.3	Trắng đục	Tròn	Que dài	Lài	Nguyên	0,6 – 1,7
5	CT4.2	Trắng đục	Tròn	Que dài	Lài	Nguyên	0,7 – 1,3
6	CT8.2	Trắng đục	Tròn	Que ngắn	Lài	Nguyên	0,6 – 1,1
7	CT8.1	Trắng sữa	Tròn	Que dài	Mô	Nguyên	0,2 – 0,6
8	DL4.4	Trắng sữa	Tròn	Que dài	Mô	Nguyên	0,8 – 1,3
9	DL8.3	Trắng đục	Tròn	Que dài	Lài	Nguyên	0,5 – 0,9
10	DL1.2	Trắng sữa	Tròn	Que dài	Lài	Nguyên	0,4 – 0,8
11	DL4.5	Trắng đục	Tròn	Que dài	Lài	Nguyên	0,5 – 1,0
12	DL1.4	Trắng đục	Tròn	Que dài	Lài	Nguyên	0,6 – 2,2
13	DL8.4	Trắng đục	Tròn	Que dài	Mô	Nguyên	0,6 – 1,2
14	DL8.5	Trắng sữa	Tròn	Que dài	Mô	Nguyên	0,7 – 1,2
15	DL9	Trắng đục	Tròn	Que dài	Mô	Nguyên	1,0 - 2,2
16	DL1	Trắng đục	Tròn	Que dài	Lài	Nguyên	0,7 – 1,2
17	AG1.1	Trắng đục	Tròn	Que ngắn	Lài	Nguyên	0,2 - 0,6
18	AG1.2	Trắng sữa	Tròn	Que ngắn	Mô	Nguyên	0,3 - 0,6
19	AG4	Trắng sữa	Tròn	Que dài	Mô	Nguyên	0,5 - 1,6
20	AG11	Trắng sữa	Tròn	Que ngắn	Mô	Nguyên	0,3 - 1,5
21	AG12	Trắng sữa	Tròn	Que ngắn	Mô	Nguyên	0,3 - 1,7
22	AG1.4	Trắng đục	Tròn	Que ngắn	Mô	Nguyên	0,5 - 2,2

Ghi chú: Ký hiệu “CT” là mẫu được thu tại thành phố Cần Thơ; ký hiệu “DL” là mẫu được thu tại tỉnh Đắk Lắk và ký hiệu “AG” là mẫu được thu tại tỉnh An Giang.

3.2. Khả năng chịu được môi trường pH thấp của các chủng FLAB

Một trong những điều kiện để vi sinh vật được ứng dụng trong các sản phẩm probiotic là khả năng chịu được pH thấp của dạ dày, pH dạ dày của người dao động từ 1,5-3,0 [15]. Trong 22 chủng FLAB nghiên cứu, số lượng các chủng FLAB đều có xu hướng tăng tỷ lệ sống sót khi pH môi trường nuôi cấy tăng lên (Bảng 4). Kết quả nghiên cứu cho thấy có 15 chủng có khả năng sống sót trong điều kiện pH từ 1,5 đến 3,0 với tỷ lệ sống sót từ 39,0 - 97,5%. Đặc biệt, chủng AG11 là chủng vi khuẩn vượt trội nhất, tỷ lệ sống sót trên 80% ở tất cả các mức pH khảo sát, khác biệt có ý nghĩa thống kê với các chủng vi khuẩn còn lại với mức ý nghĩa 5%.

Khả năng chịu acid không chỉ phụ thuộc vào giống và loài vi khuẩn mà còn phụ thuộc rất nhiều vào cơ chế và mỗi cơ chế hoạt động ở độ pH nhất định. Có rất nhiều cơ chế để vi khuẩn có

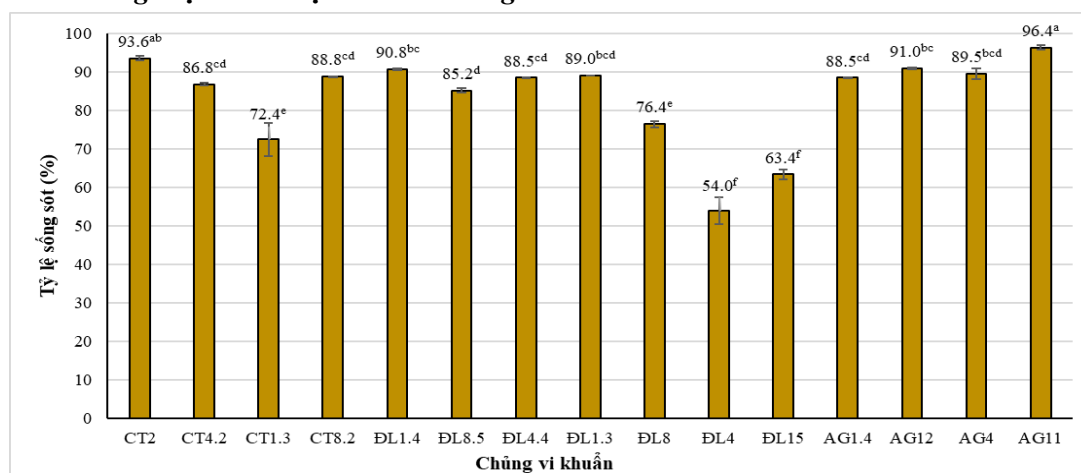
khả năng chịu đựng được môi trường pH thấp như bơm proton H^+ ra bên ngoài để cân bằng pH nội bào nhờ phức hợp enzyme -ATPase hoặc tái cấu trúc vỏ tế bào (hình thành màng sinh học) hoặc sản xuất kiềm [16], một số vi khuẩn chịu acid nói chung và vi khuẩn sinh acid lactic nói riêng, các chủng vi khuẩn này thường được trang bị màng ít thấm hơn để giảm sự xâm nhập của proton H^+ vào tế bào [17]. Bên cạnh đó, các chủng vi khuẩn lactic có thể tồn tại ở điều kiện pH thấp nhờ vào cơ chế dung nạp acid dựa trên việc tiêu thụ quá nhiều proton trong tế bào chất để duy trì cân bằng pH nội môi trong môi trường acid [16], [18].

Bảng 4. Tỷ lệ sống sót của các chủng vi khuẩn FLAB phân lập trong điều kiện pH thấp

STT	Chủng vi khuẩn	Tỷ lệ sống sót (%) tại các giá trị pH			
		1,5	2,0	2,5	3,0
1	CT1.3	43,2 ^{gh}	57,5 ^{cde}	61,7 ^{efg}	83,3 ^{fgh}
2	CT2	51,6 ^{def}	81,0 ^b	80,7 ^b	77,2 ⁱ
3	CT1.4	48,8 ^{efg}	61,8 ^{cd}	79,8 ^b	97,5 ^a
4	CT4.2	48,6 ^{efg}	45,4 ^g	57,8 ^g	86,2 ^{ef}
5	CT8.2	39,0 ^h	50,0 ^{fg}	60,7 ^{efg}	52,2 ^m
6	ĐL15	63,1 ^c	54,3 ^{ef}	74,9 ^{bc}	81,1 ^h
7	ĐL1.3	49,4 ^{ef}	63,0 ^{cd}	65,5 ^{def}	84,9 ^{fg}
8	ĐL4	54,0 ^{de}	50,5 ^{fg}	62,1 ^{defg}	83,1 ^{cgh}
9	ĐL4.4	43,3 ^{gh}	62,0 ^{cd}	92,3 ^a	88,6 ^{de}
10	ĐL4.5	0,0 ⁱ	0,0 ^h	0,0 ^h	0,0 ⁿ
11	ĐL5.2	0,0 ⁱ	0,0 ^h	59,1 ^{efg}	62,3 ^k
12	ĐL8	47,3 ^{fg}	61,6 ^{cd}	66,3 ^{de}	68,7 ^j
13	ĐL8.3	0,0 ⁱ	52,6 ^{ef}	58,5 ^{fg}	82,1 ^{gh}
14	ĐL8.4	0,0 ⁱ	0,0 ^h	0,0 ^h	0,0 ⁿ
15	ĐL8.5	64,4 ^c	75,2 ^b	69,3 ^{cd}	81,7 ^{gh}
16	ĐL9	0,0 ⁱ	0,0 ^h	0,0 ^h	0,0 ⁿ
17	AG1.1	0,0 ⁱ	61,6 ^{cd}	56,7 ^g	83,3 ^{fgh}
18	AG1.2	0,0 ⁱ	56,3 ^{def}	56,3 ^g	58,4 ^l
19	AG1.4	57,0 ^d	64,3 ^c	74,1 ^{bc}	91,8 ^{cd}
20	AG4	70,8 ^b	74,0 ^b	87,3 ^a	89,1 ^{de}
21	AG11	88,3 ^a	91,9 ^a	93,8 ^a	96,4 ^{ab}
22	AG12	75,3 ^b	77,5 ^b	93,7 ^a	94,0 ^{bc}

Ghi chú: Các giá trị có mẫu tự giống nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 5% theo kiểm định Tukey

3.3. Khả năng chịu muối mặn của các chủng FLAB



Hình 2. Biểu đồ thể hiện tỷ lệ sống sót của các chủng vi khuẩn FLAB trong môi trường FYP bổ sung 0,3% muối mặn

Ghi chú: Các giá trị có mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 5% theo kiểm định Tukey

Kết quả thử nghiệm cho thấy tất cả các chủng FLAB được tuyển chọn đều có khả năng chịu được môi trường chứa 0,3% muối mật với tỷ lệ sống sót cao từ 54,0 - 96,4%. Trong đó, chủng AG11 có khả năng kháng muối mật cao nhất với tỷ lệ sống sót đạt 96,4%, khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với chủng CT2 nhưng có khác biệt ý nghĩa thống kê so với các chủng vi khuẩn còn lại (Hình 2).

Tính nhạy cảm của vi khuẩn, đặc biệt là vi khuẩn Gram dương đối với muối mật có liên quan đến sự tương tác trực tiếp của chúng với màng tế bào. Các cơ chế thải muối mật đã được nghiên cứu rộng rãi ở LAB, khả năng tồn tại của vi sinh vật đòi hỏi các cơ chế bảo vệ khác nhau như các bơm thải hoặc sản sinh hệ enzyme thủy phân muối mật (BSH) và [16], [19].

3.4. Khả năng chịu được các môi trường mô phỏng đường tiêu hóa của các chủng FLAB

Các chủng vi khuẩn khi được thương mại thành sản phẩm probiotic thì chúng sẽ phải vượt qua các yếu tố có thể tác động tiêu cực đến sự tăng trưởng của hệ tiêu hóa như môi trường dạ dày bao gồm pepsin, acid dạ dày và môi trường ruột bao gồm muối mật, trypsin và pH cao. Do đó, chủng vi sinh buộc phải có khả năng chịu acid và dịch mật hoặc các cơ chế loại trừ khác để tồn tại trong ruột [20] và khả năng kháng lại một số enzyme đặc trưng có trong hệ tiêu hóa [21].

Kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ sống sót của các chủng FLAB đều có sự suy giảm trong cả ba loại môi trường ruột non (SIJ), khoang miệng (ASJ) và dạ dày (SGJ). Tuy nhiên tỷ lệ sống sót của các chủng FLAB trong cả ba loại môi trường này đa số đều đạt trên 70% (ngoại trừ chủng ĐL4 với tỷ lệ sống sót chỉ trên 50%) (Bảng 5), kết quả này tương tự với nghiên cứu của Zhang và cộng sự [22].

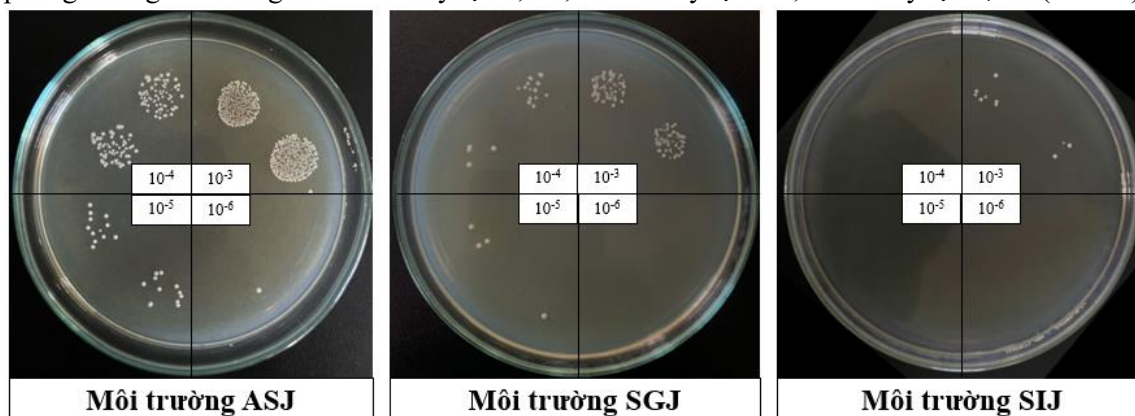
Bảng 5. Tỷ lệ sống sót của các chủng FLAB phân lập trong hệ tiêu hóa mô phỏng

STT	Chủng vi khuẩn	Tỷ lệ sống sót (%)		
		Khoang miệng (ASJ)	Dạ dày (SGJ)	Ruột non (SIJ)
1	CT 2	95,73 ^{ab}	78,32 ^g	89,70 ^{bcd}
2	CT4.2	87,08 ^{defg}	90,67 ^{cd}	93,62 ^{abc}
3	CT 1.3	88,55 ^{cdef}	89,74 ^{cde}	74,91 ^h
4	CT 8.2	81,63 ^g	89,11 ^{cde}	84,73 ^{def}
5	ĐL 1.4	88,13 ^{cdefg}	89,38 ^{cde}	97,31 ^a
6	ĐL 8.5	83,77 ^{efg}	88,28 ^{de}	88,64 ^{bcde}
7	ĐL 4.4	94,50 ^{abc}	86,11 ^{ef}	86,52 ^{de}
8	ĐL 1.3	88,25 ^{cdefg}	97,51 ^a	94,31 ^{ab}
9	ĐL 8	91,19 ^{bcd}	97,21 ^a	85,75 ^{def}
10	ĐL 4	56,99 ^h	56,53 ^h	51,00 ⁱ
11	ĐL 15	88,60 ^{cdef}	96,38 ^{ab}	76,17 ^{gh}
12	AG 1.4	88,77 ^{cdef}	90,84 ^{cd}	82,45 ^{efg}
13	AG12	90,11 ^{bcde}	93,04 ^{bc}	88,06 ^{bcde}
14	AG4	82,95 ^{fg}	83,60 ^f	87,35 ^{cde}
15	AG11	98,95 ^a	95,31 ^{ab}	79,06 ^{efgh}

Ghi chú: Các giá trị có mẫu tự giống nhau trong cùng loại môi trường thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 5% theo kiểm định Tukey.

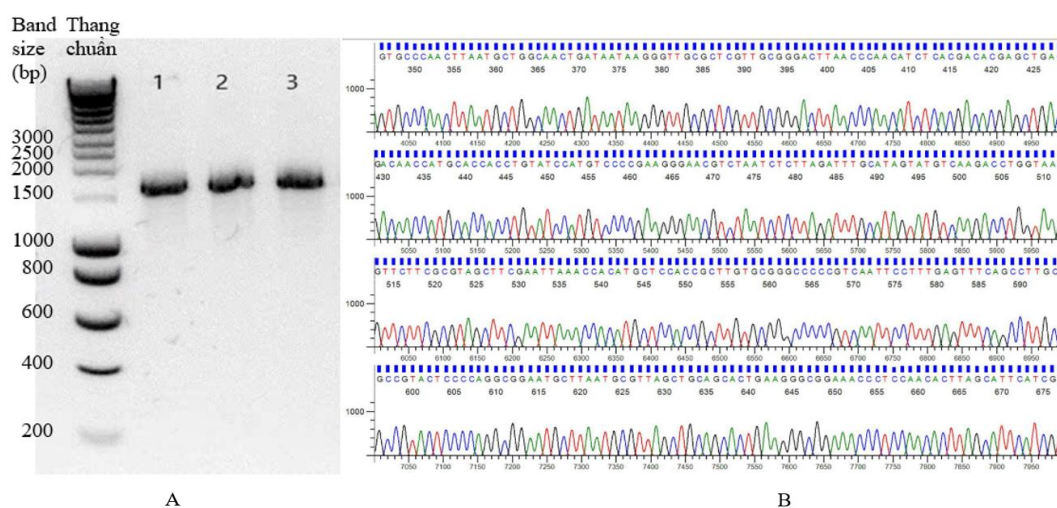
Sau khi được đưa vào cơ thể vật chủ, các lợi khuẩn sẽ phải đối mặt với tất cả các yếu tố kháng khuẩn trong dạ dày (pepsin, acid dạ dày và pH thấp) và ruột (muối mật, trypsin), cũng như sự kích thích bởi nhiệt độ bên trong cơ thể (khoảng 37,5 °C), buộc các lợi khuẩn phải có khả năng chịu acid và mật hoặc các cơ chế loại trừ khác để tồn tại trong ruột [23]. Nghiên cứu của Liu và cộng sự [24] đã chỉ ra rằng khả năng chịu đựng trong điều kiện hệ tiêu hóa mô phỏng của các chủng LAB là đặc hiệu theo từng chủng. Theo nghiên cứu của Derrien và Vlieg [25] pancreatin có thể có tác động tiêu cực đến các tế bào probiotic, nhưng cho đến nay, cơ chế hoạt động của loại enzyme này vẫn chưa được xác định rõ ràng. Mặc dù tỷ lệ sống sót của tất cả các chủng FLAB đều trên 80% tại điều kiện khoang miệng nhân tạo (ngoại trừ chủng ĐL4) thì đến điều kiện dạ dày và ruột non số lượng FLAB có tỷ lệ sống sót trên 80% lại suy giảm lần lượt là 13/15 và 11/15 chủng khảo sát. Kết quả trong nghiên cứu này trái ngược với kết quả của Yesica và cộng sự [26] khi các chủng LAB lại bị tác động mạnh khi tiếp xúc với môi trường dạ dày với

tỷ lệ sống sót thấp hơn khi chúng tiếp xúc với môi trường ruột mô phỏng. Từ các kết quả nghiên cứu đã tuyển chọn được chủng FLAB - AG11 có khả năng kháng cao trong môi trường mô phỏng đường tiêu hóa gồm ASJ với tỷ lệ 98,9%, SGJ với tỷ lệ 95%, SIJ với tỷ lệ 79,1% (Hình 3).



Hình 3. Mật số của chủng vi khuẩn AG11 trên môi trường FYP agar
Ghi chú: 10^{-3} ; 10^{-4} ; 10^{-5} và 10^{-6} là nồng độ pha loãng huyền phù vi khuẩn

3.5. Định danh chủng FLAB có tiềm năng



Hình 4 Kết quả điện di và giải trình tự gene của chủng vi khuẩn AG11

Ghi chú: A: Kết quả điện di trên gel agarose 1% và B: Trình tự vùng gene 16S với mỗi tổng

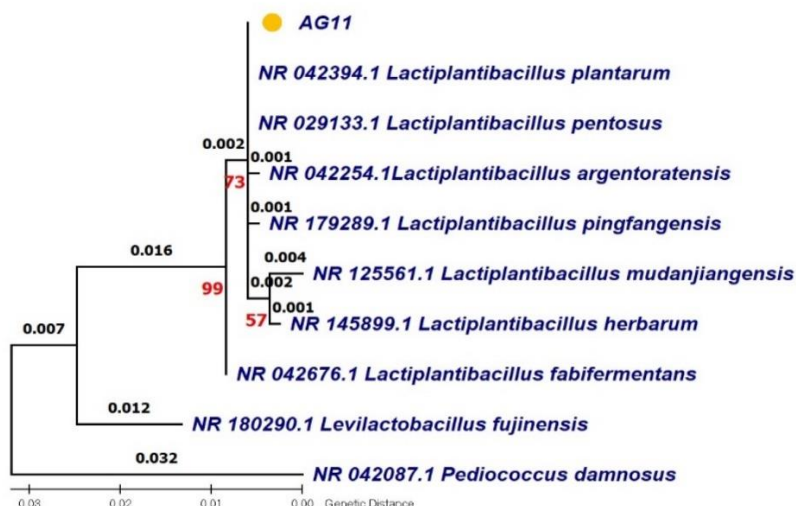
Từ kết quả nghiên cứu trên cho thấy chủng FLAB - AG11 có tiềm năng cao được tuyển chọn để tiến hành khuếch đại trình tự gene 16S rRNA (Hình 4). Kết quả BLAST trình tự vùng gen 16S trên ngân hàng gene NCBI và từ giản đồ phả hệ cho thấy chủng vi khuẩn AG11 được phân loại cùng nhóm với hai chủng vi khuẩn *Lactiplantibacillus plantarum* (mã gene NR042394.1) và *Lactiplantibacillus pentosus* (mã gene NR029133.1) với độ tương đồng đạt 99,45%, mức độ tin cậy của nhánh được thể hiện qua chỉ số bootstrap 73% (Hình 5a và 5b), với kích thước đoạn gene đạt 975 bp. Kết quả so sánh trình tự gene 16S rRNA giữa chủng AG11 và các mã gene trên NCBI cho thấy số nucleotide bảo tồn là 817/869 và số nucleotide biến đổi là 51/869 (Hình 5c).

L. pentosus và *L. plantarum* đều là vi khuẩn lactic có tiềm năng sinh học, chúng là những loài riêng biệt nhưng có mối quan hệ gần gũi. Tuy nhiên, *L. plantarum* được nghiên cứu rộng rãi hơn và được biết đến với các đặc tính probiotic đa dạng. Cả hai loài đều có thể góp phần vào sức khỏe đường ruột, nhưng *L. plantarum* đã được chứng minh là có nhiều lợi ích sức khỏe tiềm năng hơn [27] và [28]. Cho đến nay, *Lactiplantibacillus plantarum* đã được báo cáo là loài FLAB từ các nguồn giàu fructose, bao gồm cả côn trùng như ong [29]. *L. plantarum*, ngoài việc là một loại vi

khủng probiotic có đặc tính tốt, còn là một vi sinh vật đa năng với khả năng cải thiện các đặc tính chức năng của thực phẩm lên men, mang lại nhiều ứng dụng khác nhau trong ngành công nghiệp thực phẩm [30], [31]. *L. plantarum* được tìm thấy ổn định ở nhiều nguồn khác nhau, chúng có khả năng cải thiện chất lượng dinh dưỡng [32], hoạt tính chống oxy hóa và đặc tính hương vị của thực phẩm cùng với hoạt động kháng khuẩn [33], giảm các hợp chất không mong muốn và cải thiện thời hạn sử dụng [32]. Bên cạnh đó, bacteriocin của *L. plantarum* được coi chất bảo quản sinh học và được chứng minh an toàn để sử dụng trong ngành công nghiệp thực phẩm [34].

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Lactiplantibacillus plantarum strain NRRL B-14768 16S ribosomal RNA, partial sequence	Lactiplantibacillu...	1637	1637	100%	0.0	99.45%	1474	NR_042394.1
☒	Lactiplantibacillus paraplantarum strain DSM 10667 16S ribosomal RNA, partial sequence	Lactiplantibacillu...	1637	1637	100%	0.0	99.45%	1502	NR_025447.1
☒	Lactiplantibacillus plantarum strain CIP 103151 16S ribosomal RNA, partial sequence	Lactiplantibacillu...	1637	1637	100%	0.0	99.45%	1527	NR_104573.1
☒	Lactiplantibacillus plantarum strain NBRC 15891 16S ribosomal RNA, partial sequence	Lactiplantibacillu...	1637	1637	100%	0.0	99.45%	1492	NR_113338.1
☒	Lactiplantibacillus pentosus strain 124-2 16S ribosomal RNA, partial sequence	Lactiplantibacillu...	1637	1637	100%	0.0	99.45%	1519	NR_029133.1
☒	Lactiplantibacillus plantarum strain JCM 1149 16S ribosomal RNA, partial sequence	Lactiplantibacillu...	1637	1637	100%	0.0	99.45%	1519	NR_115605.1
☒	Lactiplantibacillus plantarum strain NBRC 15891 16S ribosomal RNA, partial sequence	Lactiplantibacillu...	1637	1637	100%	0.0	99.45%	1454	NR_112690.1
☒	Lactiplantibacillus plantarum strain JCM 1149 16S ribosomal RNA, partial sequence	Lactiplantibacillu...	1637	1637	100%	0.0	99.45%	1466	NR_117813.1
☒	Lactiplantibacillus pingfangensis strain 382-1 16S ribosomal RNA, partial sequence	Lactiplantibacillu...	1631	1631	100%	0.0	99.33%	1425	NR_179289.1

(a)



(b)

M: M12: Sequence Data Explorer (AG11_Aln (1).fae)									
Data	Display	Search	Groups	Highlight	Statistics	Windows	Help		
1. AG11 Trimmed									
2. NR 029133.1:538-1438 Lactiplantibacillus pentosus strain 124-2 16S ribosomal RNA partial sequence									
3. NR 042087.1:558-1458 Pediococcus damnosus strain DSM 20331 16S ribosomal RNA partial sequence									
4. NR 042254.1:537-1438 Lactiplantibacillus argentoratensis strain DKO 22 16S ribosomal RNA partial sequence									
5. NR 042394.1:531-1431 Lactiplantibacillus plantarum strain NRRL B-14768 16S ribosomal RNA partial sequence									
6. NR 042676.1:545-1445 Lactiplantibacillus fabifermentans strain LMG 24284 16S ribosomal RNA partial sequence									
7. NR 125561.1:506-1406 Lactiplantibacillus mudanjiangensis strain 11050 16S ribosomal RNA partial sequence									
8. NR 145899.1:505-1372 Lactiplantibacillus herbarum strain TCF032-E4 16S ribosomal RNA partial sequence									
9. NR 179289.1:495-1395 Lactiplantibacillus pingfangensis strain 382-1 16S ribosomal RNA partial sequence									
10. NR 180290.1:499-1400 Levilactobacillus fujinensis strain 218-6 16S ribosomal RNA partial sequence									

(c)

Hình 5 Kết quả định danh của chủng vi khuẩn AG11
 (a) Kết quả BLAST trình tự gene trên ngân hàng gene NCBI;
 (b) Cây phân loại loài; (c) So sánh trình tự gene bằng phần mềm MEGA 12

4. Kết luận

Kết quả của nghiên cứu đã phân lập được 22 chủng FLAB, tuyển chọn được 15/22 chủng vi khuẩn có khả năng sống tốt trong môi trường pH thấp với tỷ lệ sống sót dao động từ 39% đến

97,5%. Trong đó tất cả các chủng vi khuẩn có khả năng chịu được môi trường có bổ sung 0,3% muối mật và có 9 chủng FLAB có khả năng kháng lại cả ba loại môi trường đường ruột mô phỏng, với tỷ lệ sống sót đều trên 80%. Đặc biệt, chủng vi khuẩn AG11 là chủng vi khuẩn đầy tiềm năng khi đạt tỷ lệ sống sót ở pH từ 2 đến 3 đều trên 90%, có khả năng chịu được muối mật, môi trường mô phỏng khoang miệng, dạ dày và ruột non với tỷ lệ sống sót đạt lần lượt là 96,4%; 98,9%; 95% và 79,1%. Kết quả giải trình tự đoạn gen 16S rRNA cho thấy chủng vi khuẩn AG11 là chủng *Lactiplantibacillus plantarum* và *Lactiplantibacillus pentosus* với độ tương đồng là 99,45%. Với kết quả nghiên cứu này, chủng vi khuẩn *Lactiplantibacillus* AG11 là chủng vi khuẩn tiềm năng trong ứng dụng sản xuất các sản phẩm probiotic trong tương lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] A. Zapašnik, B. Sokołowska, and M. Bryła, "Role of lactic acid bacteria in food preservation and safety," *Foods (Basel, Switzerland)*, vol. 11, no. 9, 2022, Art. no. 1283.
- [2] M. H. Floch, W. A. Walker, and M. E. Sanders, "Recommendations for probiotic use—2015 update: Proceedings and consensus opinion," *Journal of Clinical Gastroenterology*, vol. 49, no. Suppl. 1, pp. 69–73, 2018.
- [3] N. B. Kristensen, T. Bryrup, and K. H. Allin, "Alterations in fecal microbiota composition by probiotic supplementation in healthy adults: A systematic review of randomized controlled trials," *Genome Medicine*, vol. 8, 2016, Art. no. 52.
- [4] E. Razmpoosh, A. Javadi, H. S. Ejtahed, P. Mirmiran, M. Javadi, and A. Yousefinejad, "The effect of probiotic supplementation on glycemic control and lipid profile in patients with type 2 diabetes: A randomized placebo controlled trial," *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, vol. 13, no. 1, pp. 175–182, 2019.
- [5] H. S. Ejtahed, R. Y. Tito, S. D. Siadat, S. H. Ranjbar, Z. H. Tavassol, L. Rymenans, K. Verbeke, A. R. Soroush, J. Raes, and B. Larijani, "Metformin induces weight loss associated with gut microbiota alteration in non-diabetic obese women: A randomized double-blind clinical trial," *Eur. J. Endocrinol.*, vol. 180, no. 3, pp. 165–176, 2019.
- [6] S. Sangwan and R. Singh, "Synergistic effect of oats and LGG fermented milk on lowering hypercholesterolemia in rats," *Journal of Cereal Science*, vol. 82, pp. 164–169, 2018.
- [7] S. Dasari, C. Kathera, A. Janardhan, A. P. Kumar, and B. Viswanath, "Surfacing role of probiotics in cancer prophylaxis and therapy: A systematic review," *Clinical Nutrition*, vol. 36, no. 6, pp. 1465–1472, 2017.
- [8] D. Bulgarelli, K. Schlaeppli, S. Spaepen, E. V. L. Themaat, and P. S. Lefert, "Structure and functions of the bacterial microbiota of plants," *Annual Review of Plant Biology*, vol. 64, no. 1, 2013, doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120106.
- [9] Y. Wang, J. Wu, M. Lv, Z. Shao, M. Hungwe, J. Wang, and W. Geng, "Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 9, 2021, Art. no. 612285.
- [10] A. Endo and S. Okada, "Reclassification of the genus *Leuconostoc* and proposals of *Fructobacillus fructosus* gen. nov., comb. nov., *Fructobacillus durionis* comb. nov., *Fructobacillus ficulneus* comb. nov. and *Fructobacillus pseudoficulneus* comb. nov.," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 58, pp. 2195–2205, 2008.
- [11] A. Pachla et al., "Fascinating fructophilic lactic acid bacteria associated with various fructose-rich niches," *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska, section C-Biologia*, vol. 72, no. 2, pp. 41–50, 2019.
- [12] A. Endo and S. Salminen, "Honeybees and beehives are rich sources for fructophilic lactic acid bacteria," *Syst. Appl. Microbiol.*, vol. 36, pp. 444–448, 2013.
- [13] A. Abdelazez, H. Abdelmotaal, S. E. Evivie, M. Bikheet, R. Sami, H. Mohamed, and X. Meng, "Verification of *Lactobacillus brevis* tolerance to simulated gastric juice and the potential effects of postbiotic gamma-aminobutyric acid in streptozotocin-induced diabetic mice," *Food Science and Human Wellness*, vol. 11, no. 1, pp. 165–176, 2022.
- [14] J. Sambrook and D. W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, vol. 1, 2001.
- [15] S. Fujimori, "Gastric acid level of humans must decrease in the future," *World J. Gastroenterol.*, vol. 26, no. 43, pp. 6706–6709, 2020.
- [16] M. M. Ayyash, A. K. Abdalla, N. S. Alkalbani, M. A. Baig, M. S. Turner, S. Q. Liu, and N. P. Shah, "Invited review: Characterization of new probiotics from dairy and nondairy products—Insights into acid tolerance, bile metabolism and tolerance, and adhesion capability," *Journal of Dairy Science*, vol. 104, no. 8, pp. 8363–8379, 2022.
- [17] C. Sohlenkamp, "Membrane Homeostasis in Bacteria upon pH Challenge," in *Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes*, Springer, 2017, pp. 1–13.

- [18] N. Guan and L. Liu, "Microbial response to acid stress: mechanisms and applications," *Appl. Microbiol Biotechnol*, vol. 104, no. 1, pp. 51-65, 2020.
- [19] Y. Tian, W. Gui, I. Koo, P. B. Smith, E. L. Allman, R. G. Nichols, B. Rimal, J. Cai, Q. Liu, and A.D. Patterson, "The microbiome modulating activity of bile acids," *Gut Microbes*, vol. 11, no. 4, pp. 979-996, 2020.
- [20] S. Han, Y. Lu, J. Xie, Y. Fei, G. Zheng, Z. Wang, J. Liu, L. Lv, Z. Ling, B. Berglund, M. Yao, and L. Li, "Probiotic gastrointestinal transit and colonization after oral administration: A long journey," *Front Cell Infect Microbiol*, vol. 11, 2021, Art. no. 609722.
- [21] M. C. Nandha and R. M. Shukla, "Exploration of probiotic attributes in lactic acid bacteria isolated from fermented *Theobroma cacao* L. fruit using in vitro techniques," *Front. Microbiol.*, vol. 14, 2023, Art. no. 1274636.
- [22] W. Zhang, S. Lai, Z. Zhou, J. Yang, H. Liu, Z. Zhong, H. Fu, Z. Ren, L. Shen, S. Cao, L. Deng, and G. Peng, "Screening and evaluation of lactic acid bacteria with probiotic potential from local Holstein raw milk," *Front. Microbiol.*, vol. 13, 2022, Art. no. 2918774.
- [23] G. V. Pereira, B. D. O. Coelho, A. I. M. Júnior, V. Thomaz-Soccol, and C. R. Soccol, "How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria," *Biotechnol. Adv.*, vol. 36, pp. 2060–2076, 2018.
- [24] W. Liu, M. C. Hen, L. Duo, J. Wang, S. Guo, H. Sun, B. Mengh, and H. Zhang, "Characterization of potentially probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from human colostrum," *J. Dairy Sci.*, vol. 103, pp. 4013–4025, 2020.
- [25] M. Derrien and J. E. T. F. H. Vlieg, "Activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota," *Trends Microbiol*, vol. 23, pp. 354-366, 2015.
- [26] R. Yesica, V. B. Rogelio, C. G. Concepción, M. L. Chikindas, and P. A. Edith, "Probiotic and functional potential of lactic acid bacteria isolated from pulque and evaluation of their safety for food applications," *Front. Microbiol.*, vol. 14, 2023, Art. no. 1241581.
- [27] W. Xue, C. Liu, Y. Liu, H. Ding, C. An, S. Zhang, S. Ma, and Q. Zhang, "Probiotic evaluation of *Lactiplantibacillus pentosus* 68-1, a Rutin conversion strain isolated from Jiangshui, by genomic analysis and tests in vitro," *Fermentation*, vol. 10, 2024, Art. no. 87.
- [28] Z. Wang, J. Wu, Z. Tian, Y. Si, H. Chen, and J. Gan, "The mechanisms of the potential Probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* against Cardiovascular disease and the recent developments in its fermented foods," *Foods*, vol. 11, 2022, Art. no. 2549.
- [29] A. Endo, Y. Futagawa-Endo, M. Sakamoto, M. Kitahara, and L. M. Dicks, "*Lactobacillus florum* sp. nov., a fructophilic species isolated from flowers," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, vol. 60, pp. 2478–2482, 2010.
- [30] G. He, H. Long, J. He, and C. Zhu, "The immunomodulatory effects and applications of probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* in vaccine development," *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, vol. 16, no. 6, pp. 1 – 22, 2024.
- [31] M. Iorizzo, C. Di Martino, F. Letizia, T. W. Crawford, and G. Paventi, "Production of conjugated linoleic acid (CLA) by *Lactiplantibacillus plantarum*: A review with emphasis on fermented foods," *Foods (Basel, Switzerland)*, vol. 13, no. 7, 2024, Art. no. 975.
- [32] S. S. Behera, R. C. Ray, and N. Zdolec, "Lactobacillus plantarum with functional properties: An approach to increase safety and shelf-life of fermented foods," *BioMed Research International*, vol. 2018, 2018, Art. no. 9361614.
- [33] R.-H. Liu, A.-Q. Sun, Y. Liao, Z.-X. Tang, S.-H. Zhang, X. Shan, and J.-T. Hu, "Lactiplantibacillus plantarum regulated intestinal microbial community and cytokines to inhibit *Salmonella typhimurium* infection," *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, vol. 15, no. 5, pp. 1355–1370, 2023.
- [34] Z. Zhang, H. Niu, Q. Qu, D. Guo, X. Wan, Q. Yang, Z. Mo, S. Tan, Q. Xiang, X. Tian, H. Yang, and Z. Liu, "Advancements in *Lactiplantibacillus plantarum*: probiotic characteristics, gene editing technologies and applications," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, pp. 1-22, 2025, doi: 10.1080/10408398.2024.2448562.